



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Características del biofilm oral formado sobre implantes dentales

Berta Cortés Acha

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

Programa de Doctorat en Medicina i Recerca Translacional

Tesis Doctoral

Características del biofilm oral formado sobre implantes dentales

DOCTORANDA

Berta Cortés Acha

DIRECTORES DE TESIS

Prof. Dr. Eduard Valmaseda Castellón

Dr. Rui Figueiredo

Universitat de Barcelona. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Departament
d'Odontostomatologia

El Prof. Eduard Valmaseda Castellón, Profesor Titular de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona y el Dr. Rui Figueiredo, Profesor Asociado de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona,

CERTIFICAN: Que el presente trabajo que lleva como título: “Características del biofilm oral formado sobre implantes dentales” presentado por Berta Cortés Acha como Tesis Doctoral, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Odontostomatología de la Universitat de Barcelona y corresponde fielmente a los resultados obtenidos. Una vez redactada la presente Memoria Doctoral ha sido revisada por nosotros y consideramos que cumple los requisitos para ser defendida y aspirar al Grado de Doctor en Odontología delante del tribunal que en su día se designe.

Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes firmamos el presente certificado.

Barcelona, 11 de abril de 2019,



Prof. Dr. Eduard Valmaseda Castellón
Profesor titular Universitat de Barcelona



Dr. Rui Figueiredo
Profesor asociado Universitat de Barcelona

*“Tranquila hija que todo llega,
todo llega y todo pasa”*

AGRADECIMIENTOS

“Si he podido ver mas allá es porque me subí a hombros de gigantes” Isaac Newton

Estos son mis gigantes.

El Prof. Dr. Eduard Valmaseda-Castellón, director del Máster de Cirugía Bucal e Implantología Bucofacial. Gracias por tu dedicación, por enseñarme a cuestionar las cosas y no conformarme.

El Dr. Rui Figueiredo, coordinador del Máster de Cirugía Bucal e Implantología Bucofacial. Gracias por esa paciencia infinita pese a mi cabezonería y por creer en mis posibilidades.

La Dra. Vanessa Blanc, directora del Departamento de I+D del Centro de Investigación DentaId. Gracias por esa ayuda constante, por enseñarme y sobretodo por hacerme sentir como una más.

El Dr. Rubén León, director del Departamento de I+D del Centro de Investigación DentaId. Gracias por esa ayuda y ese apoyo desinteresado desde la recogida de aquel primer pilar hasta la redacción de esta tesis.

La Dra. M^a Victoria Acha y el Dr. Fco. Javier Cortés, mis padres, quienes son mi ejemplo a seguir en la vida, como personas y como profesionales. Gracias por tanto apoyo y tanta ayuda, sin vosotros nada de esto hubiera sido posible.

El Sr. Ander Bilbao, mi chico. Gracias por creer en mi aun cuando yo no era capaz, por todo tu apoyo y por hacer que esta tesis haya quedado tan bonita.

Mis hermanos: Carlota, Pino, Telmo, Marcos, Jose, Nuria y Lou, que son mi familia, a la que quiero con locura y sin la cual no seríamos lo que somos.

ÍNDICE

I	LISTADO DE PUBLICACIONES PARA LA TESIS	13
II	RESUMEN.....	17
III	JUSTIFICACIÓN.....	21
IV	INTRODUCCIÓN.....	25
	DEFINICIÓN DE ENFERMEDADES PERIIMPLANTARIAS	28
	CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MUCOSITIS Y PERIIMPLANTITIS.....	30
	FACTORES DE RIESGO.....	35
	EPIDEMIOLOGÍA.....	40
	TRATAMIENTO	42
	EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO.....	47
	DIFERENCIAS ENTRE ENFERMEDAD PERIODONTAL Y ENFERMEDAD PERIIMPLANTARIA.....	49
	1. Diente y periodonto.....	49
	2. Implante y tejido periimplantario	50
	3. Periodontitis	52
	4. Periodontitis vs. periimplantitis.....	53
	5. Microbiología asociada a los implantes dentales	54
	MARCO TEÓRICO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL	64
V	OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	67
VI	APORTACIONES DE LA DOCTORANDA.....	71
VII	PRESENTACIÓN DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS	75
	1.Estudio I	77
	Objetivo	78

	Material y método	78
	Resultados	83
2. Estudio II		107
	Objetivo	108
	Material y método	108
	Resultados	112
VIII DISCUSIÓN.....		127
	ETIOLOGÍA DE LA PERIIMPLANTITIS	129
	BIOFILMS.....	131
	1. Patogenia y biofilms	133
	2. Implantes dentales y biofilms	134
	3. Composición de la microbiota periimplantaria.....	139
	4. Patogenia de las enfermedades periimplantarias	144
IX LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS		147
X FUTURAS INVESTIGACIONES Y APLICABILIDAD CLÍNICA.....		151
XI CONCLUSIONES.....		155
XII LISTADO DE LAS PRINCIPALES ABREVIACIONES.....		159
XIII BIBLIOGRAFÍA.....		163
XIV ANEXOS.....		187

I LISTADO DE PUBLICACIONES PARA LA TESIS

LISTADO DE PUBLICACIONES PARA LA TESIS

1. Cortés-Acha B, Figueiredo R, Seminago R, Roig FJ, Llorens C, Valmaseda-Castellón E. Microbiota analysis of biofilms on experimental abutments mimicking dental implants: An in vivo model. *J Periodontol.* 2017;11:1-20.
2. Cortés-Acha B, Figueiredo R, Blanc V, Soler-Ollé A, León R, Valmaseda-Castellón E. Development and viability of biofilms grown on experimental abutments mimicking dental implants: an in vivo model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019.

II RESUMEN

Desde hace más de 30 años, los implantes osteointegrados son una alternativa viable para el reemplazo de las ausencias dentarias, con un alto porcentaje de supervivencia y éxito. Sin embargo, la prevalencia de sus complicaciones biológicas no es despreciable. Se estima que entre un 12 y un 22% de los pacientes portadores de implantes padece de periimplantitis (PI), una alteración que se caracteriza por la presencia de inflamación y pérdida ósea periimplantaria. Puesto que se trata de una enfermedad inflamatoria en que las bacterias desempeñan un papel muy relevante, es interesante estudiar cómo se organizan éstas sobre la superficie de los implantes. La microbiota que coloniza los implantes dentales hasta ahora se ha considerado similar a la microbiota encontrada alrededor de dientes. En ausencia de inflamación, por ejemplo, tras un proceso de remodelado óseo, la superficie del implante queda expuesta al medio oral permitiendo el acúmulo de placa bacteriana. Para conocer más en profundidad cómo es este biofilm formado sobre la superficie expuesta de un implante dental, se diseñaron los 2 estudios que componen la presente tesis doctoral.

El primer estudio tenía como objetivo principal determinar si un pilar experimental, que simula la macro y microestructura de un implante, es un método adecuado para recoger biofilm oral. Además, también pretendió describir las características del biofilm formado sobre estos pilares. Para ello, se colocaron pilares experimentales en 15 pacientes portadores de implantes sin patología periimplantaria. Tras 14 días, los aditamentos fueron analizados con microscopía confocal y electrónica de barrido. Los 5 primeros pilares se tiñeron para determinar la cantidad de biomasa que colonizaba los aditamentos y los 10 restantes con una tinción que permitiera además diferenciar células vivas de células muertas.

Se observó un recubrimiento global de los pilares en todos los pacientes. El área supragingival mostró un mayor porcentaje de recubrimiento (38%) en comparación con el área subgingival (21%) y la ratio de bacterias vivas/muertas también fue ligeramente mayor en la zona supragingival ($p < 0.074$).

El segundo estudio pretendía identificar la composición de la microbiota formada alrededor de implantes expuestos a la cavidad bucal utilizando técnicas de metagenómica. El pilar experimental descrito anteriormente se empleó para recoger el biofilm de 10 pacientes portadores de implantes sanos. Transcurridos 14 días, se analizó dicho biofilm mediante un proceso de pirosecuenciación del gen 16S.

Se identificaron un total de 96 especies y las bacterias más frecuentemente encontradas fueron *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella denticola*. Algunas de las especies que generalmente se asocian a la periodontitis se encontraron en mayor medida en aquellos pacientes que no tenían antecedentes de periodontitis. Además, se identificaron algunas

bacterias que nunca habían sido descritas como parte del microbioma oral.

Se puede concluir que la utilización de pilares experimentales removibles permite recoger y estudiar el biofilm formado sobre implantes dentales. Por otro lado, tras 14 días de exposición a la cavidad bucal, la mayoría de la superficie de los implantes se cubrirá por un biofilm maduro y espeso compuesto por una microbiota heterogénea con predominio de *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella denticola*. Además, la cantidad y distribución del biofilm formado sobre un implante tras 14 días de exposición al medio oral no difiere entre pacientes con y sin antecedentes de periodontitis.

III JUSTIFICACIÓN

En los últimos años muchos estudios han descrito extensamente diferentes tipos de tratamientos para las patologías periimplantarias (mucositis y periimplantitis). Sin embargo, son menos los estudios que tratan de entender las causas, inicio y progresión de la enfermedad.

Los primeros artículos que trataron sobre las enfermedades periimplantarias sugerían que se asemejaban al proceso observado en la periodontitis (1) y que la microbiota que colonizaba los implantes estaba formada por bacterias periodontopatógenas (2,3). Sin embargo, en el año 2011, se empezaron a observar diferencias histológicas entre periodontitis y periimplantitis (4) e incluso algunas publicaciones sugerían que la PI no era una infección convencional causada por un grupo pequeño de bacterias periodontopatógenas. Podría más bien tratarse de una infección causada por una extensa microbiota en la que aparecen importantes y decisivas relaciones interbacterianas (5,6).

A pesar de que la PI se considera una enfermedad infecciosa, su punto de inicio y, la razón por la cual, se produce la pérdida ósea y la exposición del implante al medio oral es un tema controvertido que anima a la discusión (7). Numerosos autores postulan que la acumulación bacteriana aumenta o potencia un proceso inflamatorio, así como una pérdida ósea que progresa más rápidamente en el momento en que la superficie del implante se expone y se coloniza.

La literatura con relación al biofilm formado sobre implantes dentales y su microbiota no es escasa, pero existen serias limitaciones en el modo de recoger y procesar las muestras y, por tanto, sus resultados son difícilmente generalizables. Los estudios que analizan la microbiota formada sobre los implantes han utilizado diferentes metodologías para la recogida de muestras: puntas de papel, curetas o sondas periodontales (8–12). En cualquiera de los casos, empleando estos métodos de recogida no se puede estudiar la totalidad del biofilm adherido a la superficie rugosa o bajo las espiras del implante. Por otro lado, en las publicaciones in vivo que han analizado el biofilm, la recogida se ha efectuado empleando placas de titanio fijadas a dispositivos orales extraíbles o pilares de cicatrización (13–18). En el caso de los primeros, no se simulan las condiciones que se encuentran en el área subgingival, mientras que, en el caso de los segundos, un pilar mecanizado o levemente rugoso no simula la situación real de la superficie de un implante dental, más rugosa y con espiras. Es de vital importancia estudiar, pues, la colonización bacteriana de los implantes dentales, para así poder diseñar un tratamiento efectivo. Por este motivo, esta tesis se ha centrado en realizar 2 estudios clínicos que permitieran describir de la forma más precisa posible la estructura y la composición del biofilm que se forma sobre un implante, utilizando un dispositivo específico que permite simular un implante dental rugoso expuesto al medio oral.

IV INTRODUCCIÓN

Un área importante de la Odontología es aquella que se encarga de la restauración de la función perdida como consecuencia de la ausencia dentaria. Desde que el profesor Brånemark de la Universidad de Gotemburgo (Suecia) definió la oseointegración (19), la rehabilitación oral mediante implantes dentales ha revolucionado la Odontología restauradora.

En sus inicios, los implantes dentales fueron diseñados para el tratamiento de pacientes totalmente desdentados, con el fin de ser los pilares sobre los que anclar prótesis fijas completas (20). De forma progresiva, el tratamiento con implantes se fue extendiendo hasta convertirse en una alternativa para la reposición de cualquier ausencia dentaria (21,22). Los implantes dentales han pasado a ser, en muchas ocasiones, el tratamiento de elección para la rehabilitación no solo funcional, sino también estética, ya que poseen un porcentaje de éxito y supervivencia elevadas, que ronda el 96-98% a los 5 años y entre 92 y 97% a los 10 años (23-26). Sin embargo, su porcentaje de complicaciones, tanto mecánicas como biológicas y estéticas, también es alto. Según una revisión realizada en el año 2012, las complicaciones mecánicas afectan a un 8.8% de los implantes unitarios y las biológicas y estéticas, a un 7.1% (24).

Las complicaciones biológicas más frecuentemente encontradas son la mucositis y la periimplantitis, con prevalencias estimadas del 39% y 16% de los pacientes, respectivamente (27,28). Las consecuencias derivadas de estas complicaciones biológicas pasan no solo por un leve o moderado malestar del paciente o una deficiente estética, sino muchas veces por la aparición de infecciones o la pérdida del implante.

DEFINICIÓN DE ENFERMEDADES PERIIMPLANTARIAS

La enfermedad periimplantaria se ha definido como una alteración inflamatoria probablemente producida por una infección que se desarrolla en un individuo susceptible y que afecta a un implante osteointegrado en función (29). Se diferencian dos entidades: la mucositis y la periimplantitis.

El término periimplantitis (PI) se introdujo por primera vez hace más de 20 años como una alteración patológica infecciosa de los tejidos periimplantarios (2)(30). Años después, en el Primer Workshop Europeo de Periodoncia en 1993, el término PI se usó específicamente para definir un proceso inflamatorio destructivo que tiene lugar alrededor de implantes osteointegrados funcionales y produce la formación de bolsas y la pérdida del tejido óseo de soporte (31). Ya en ese momento se hizo una distinción importante entre la pérdida ósea debida a un proceso de remodelado fisiológico y la pérdida ósea debida a un proceso inflamatorio como podemos ver en la figura 1.

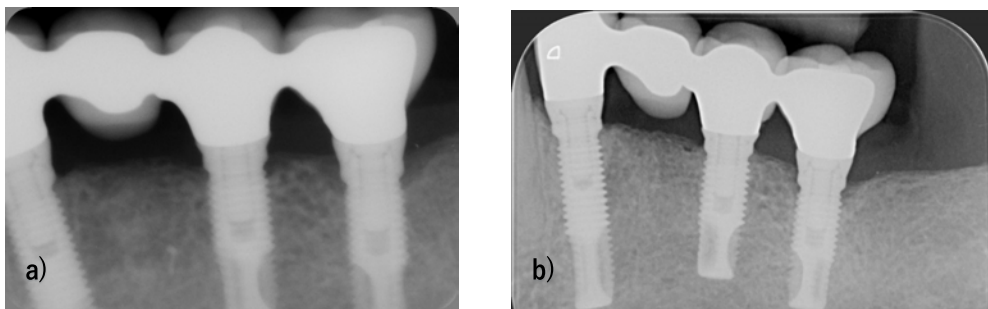


Figura 1. a) Implantes colocados en 2004, cada uno con su proceso de remodelación previa a la carga, b) los mismos implantes en 2019 con sus niveles óseos estables.

La mucositis, por otro lado, se definió desde el inicio como una inflamación reversible de los tejidos blandos que rodean un implante en función sin pérdida ósea (31). Se cree que la mucositis es una condición previa a la PI.

La evolución de mucositis a PI parece producirse de manera gradual y es difícil de identificar (32,33). Resulta difícil determinar el momento exacto en que una mucositis evoluciona a una PI y, por tanto, también es complejo identificar con exactitud la prevalencia e incidencia de ambas entidades.

Otro factor a tener en cuenta son los criterios de diagnóstico de la PI. El sangrado al sondaje, en presencia de una adecuada higiene oral, podría ser más frecuente en

implantes que en dientes, de modo que su especificidad y su valor predictivo positivo es cuestionable (32,34).

Aunque se han identificado diversos factores de riesgo, la PI se considera una enfermedad infecciosa, cuya progresión puede provocar la pérdida de la osteointegración y la consiguiente pérdida del implante dentario (35–37). No obstante, todavía es escaso el conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad, así como la interacción de los microorganismos de la cavidad oral con las superficies de los implantes.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MUCOSITIS Y PERIIMPLANTITIS

Clínicamente, la mucositis y la PI suelen cursar con: i) presencia de placa, ii) enrojecimiento, iii) inflamación, iv) pérdida de textura de la mucosa alrededor del implante y v) sangrado; este último puede ser espontáneo, desencadenado por traumatismos o por el sondaje periodontal. Generalmente no hay dolor, o bien puede ser leve. Adicionalmente, la PI está asociada a la aparición de pérdida ósea marginal progresiva, que puede acompañarse de hiperplasia o recesión de la mucosa y en ocasiones, supuración. Realizando una analogía con la periodontitis se han propuesto diversos criterios diagnósticos para la PI:

- i Profundidad de sondaje:** distancia desde el margen de la mucosa periimplantaria hasta la punta de una sonda periodontal introducida en el surco periimplantario. Gracias a la profundidad de sondaje se puede calcular la cantidad de pérdida de inserción. En dientes, es necesario sumar la distancia entre la línea amelocementaria y el margen gingival, en el caso de que exista una recesión, o restarla si se trata de una hiperplasia. En el caso de implantes es preciso tomar una referencia espacial a partir de la cual comenzar la medición, que suele ser el límite de la prótesis o la base del pilar transeptalial.

En el sondaje pueden influir diversos factores: el tipo y calibre de la sonda, la presión y el ángulo de sondaje, la presencia de inflamación de los tejidos, el diseño del implante o de la prótesis (por ejemplo, la presencia de coronas sobrecontorneadas) y la inclinación o mala posición del implante.

Es indispensable tener registros basales para poder determinar si existen cambios en los niveles de sondaje, así como emplear siempre la misma referencia espacial de medida (por ejemplo, la plataforma del implante o el inicio del cuello mecanizado).



Figura 2. Sondaje de implantes. Obsérvese cómo la sonda penetra de manera más paralela al eje del implante y hay una menor distensión del surco periimplantario cuando no hay una corona puesta.

Un sondaje con una fuerza de 0.2 – 0.3N parece no dañar la mucosa que rodea los implantes y se considera imprescindible para el diagnóstico de las enfermedades periimplantarias (29,38–40). Se recomienda además un sondaje sin la prótesis para una mayor precisión (figura 2).

- ii **Recesiones:** distancia entre la plataforma del implante (o la parte escogida como referencia) y el margen gingival (figura 3).



Figura 3. Recesiones. En ambas fotografías podemos observar cómo la superficie tratada de los implantes ha quedado expuesta al medio oral.

- iii **Sangrado al sondaje:** en 1994 se observó que los implantes sanos generalmente no presentaban sangrado alrededor del implante con el sondaje, mientras que en casos de mucositis y de PI mostraban puntos de sangrado (39) (figura 4). Años más tarde se confirmó esta teoría en un estudio que mostraba que el sangrado al sondaje en más de la mitad de las visitas y durante 2 años consecutivos tenía un valor predictivo positivo del 100% para la inestabilidad de los tejidos periimplantarios (pérdida ósea marginal) (41).

Tal y como hemos referido previamente, la fuerza de sondaje no debe exceder los 0.25N para no obtener falsos positivos, algo que no siempre es fácil de cuantificar en una situación clínica (29,42).

Por otro lado, existe una parte de la comunidad científica que no da por válido el sangrado al sondaje como criterio diagnóstico en enfermedad periimplantaria. Es el caso de Coli y colaboradores (43) que afirman en su artículo que tanto la profundidad de sondaje como el sangrado al sondaje, no pueden ser considerados como herramientas diagnósticas de salud o enfermedad periimplantaria. Según estos autores, la mucosa periimplantaria difiere anatómicamente del tejido periodontal y, por tanto, la respuesta de estos tejidos a la inserción de una sonda periodontal no será la misma que la de un tejido periodontal. Añaden, que la mucosa periimplantaria es un tejido cicatricial con un mayor componente inflamatorio, que puede tener una leve inflamación y mostrar una mayor profundidad de sondaje y sangrado, sin tratarse de un caso de PI. Ericsson y Lindhe (44) también han respaldado esta afirmación y han desmontado que la punta de

la sonda penetra en el epitelio de unión lo que provoca un sangrado por traumatismo en la mayoría de los implantes sanos.



Figura 4. Sangrado al sondaje. El sondaje pone en evidencia la inflamación del tejido periimplantario que a primera vista parece ser un tejido sin patología.

iv Supuración: no siempre está presente en la PI. No obstante, un exudado purulento (figura 5) indica la existencia de una infección y se considera un criterio diagnóstico de PI (45,46).



Figura 5. Supuración al pasar un cepillo interdental y al sondaje.

v Pérdida ósea radiográfica: se debe tener una radiografía basal, es decir, tras la colocación de la prótesis definitiva (una vez finalizado el proceso de remodelado óseo), para comparar la variación en el tiempo de los niveles óseos (figura 6).

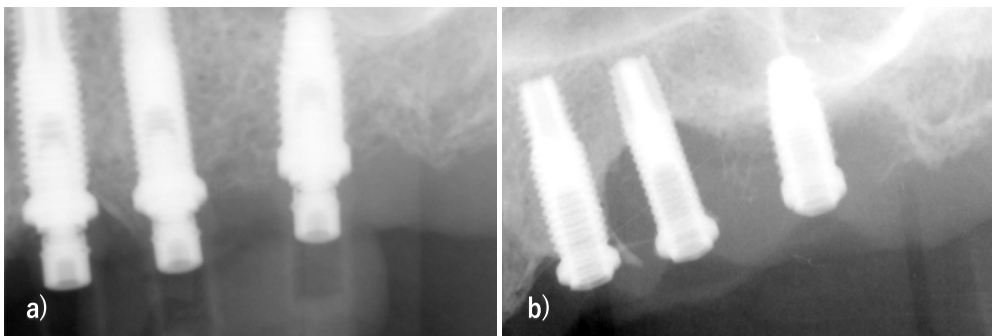


Figura 6. a) implantes colocados en 2009, b) los mismos implantes en 2019 con pérdida ósea radiográfica.

Para el diagnóstico radiológico de la pérdida ósea perimplantaria se han utilizado históricamente diferentes técnicas como la ortopantomografía o la radiografía intraoral

con la técnica de paralelización (47). Mengel y colaboradores (48) evaluaron la precisión y la calidad de las imágenes de los defectos óseos periimplantarios comparando las radiografías panorámicas, las radiografías intraorales, la TC (tomografía computada) y la TCHC (tomografía computada de haz cónico). Las dos últimas obtuvieron los mejores resultados y la TCHC fue la técnica que mostró una mejor calidad de (figura 7). Un estudio de García-García y colaboradores (49) comparó las mediciones de pérdida ósea hechas sobre radiografías intraorales con las mediciones reales hechas sobre los propios implantes en el momento de su tratamiento quirúrgico. Se observó que las mediciones radiográficas sobrestimaban un promedio de 1.3 mm la altura real del hueso periimplantario, y esto era especialmente evidente en las zonas vestibular y palatina del implante. Por otra parte, existía una subestimación en las radiografías de la profundidad del componente intraóseo del defecto periimplantario.

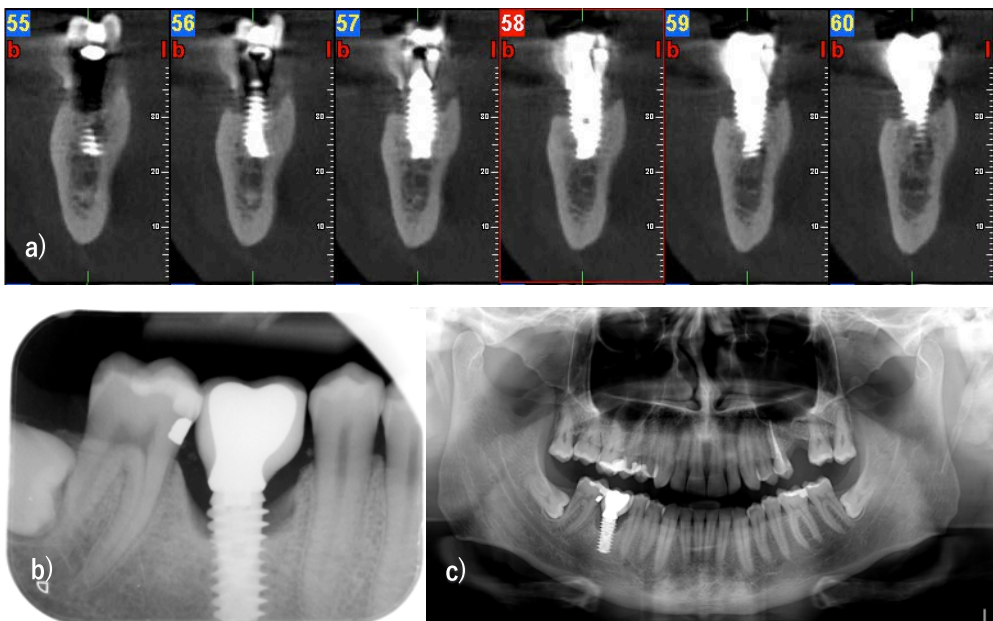


Figura 7. Pérdida ósea radiográfica de un mismo implante visto sobre a) TCHC, b) radiografía periapical y c) ortopantomografía.

- vi **Movilidad del implante:** la movilidad no es un criterio diagnóstico, puesto que muestra una falta de osteointegración o una pérdida total del soporte del implante.
- vii **Otros:** Los niveles de mediadores bioquímicos del fluido crevicular periimplantario se han estudiado con el objetivo de detectar un marcador diagnóstico de salud periimplantaria (42). Aunque un estudio reciente encontró diferencias significativas entre implantes sanos y enfermos en 12 biomarcadores del fluido crevicular (50), la mayoría de los autores afirman que los resultados de estas pruebas son poco concluyentes (42).

Recientemente, con el objetivo de unificar criterios, el consenso del grupo 4 del World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant diseases and conditions (32) hizo la siguiente definición:

- Salud periimplantaria: aquellos implantes que muestren ausencia de síntomas (molestias) y signos clínicos de inflamación (eritema e hinchazón) incluyendo la ausencia de sangrado al sondaje. La profundidad al sondaje no debería exceder los 5 mm con una fuerza de sondaje de 0.25N. Ausencia de pérdida del hueso de soporte medido mediante radiografías estandarizadas y comparadas siempre con radiografías iniciales en el momento de la carga. El hueso perdido previo a la carga es considerado como remodelado óseo. Todo cambio igual o superior a 2mm durante el primer año de función o después se considera patológico.
- Mucositis periimplantaria: aquellos casos que presenten síntomas y signos clínicos de inflamación combinados con sangrado al sondaje y/o supuración. Un punto de sangrado al sondaje sin otros signos de inflamación no será considerado patológico. Ausencia de pérdida de hueso de soporte medido radiográficamente.
- Periimplantitis: aquellos implantes que presenten síntomas y signos clínicos de inflamación con evidencia radiográfica de pérdida ósea, sin tener en cuenta el proceso de cicatrización y/o remodelado óseo (antes de la carga protésica). El sangrado al sondaje junto con la pérdida ósea se considera un marcador de PI.

FACTORES DE RIESGO

Los antecedentes de periodontitis, el consumo de tabaco, una mala higiene oral y factores inherentes al propio implante y/o a la prótesis parecen afectar el pronóstico de los implantes (51–53).

1. Factores de riesgo relacionados con el paciente

Diferentes variables, como por ejemplo una mala higiene oral, los antecedentes de periodontitis o el consumo de tabaco han sido descritos como fuertes indicadores de riesgo de PI en diversas revisiones sistemáticas (27,42,54–56).

Malmström y colaboradores (57) fueron los primeros en describir mayor pérdida de implantes en aquellos pacientes que presentaban una rápida y agresiva progresión de la periodontitis. Desde entonces, numerosas publicaciones han estudiado la relación entre los antecedentes de periodontitis y la PI; muchas de estas encontraron una clara relación entre ambas entidades (58–60), mientras que otras no lo han hecho (61–63).

En lo que respecta al consumo de tabaco diversos autores han encontrado un mayor riesgo de desarrollo de complicaciones biológicas alrededor de los implantes en pacientes fumadores (58,64–66). Sin embargo, otros no han encontrado dicha relación en pacientes incluidos en programas de mantenimiento periodontal (67–70). Un estudio publicado recientemente concluyó que la historia de periodontitis y el consumo de tabaco son factores de riesgo de la PI. No obstante, la unión de ambos factores no aumentaba el riesgo de enfermedad en comparación a la presencia de uno solo de estos factores (71).

El acúmulo de placa se ha asociado a la mucositis (72). Un estudio ha mostrado que los pacientes con un índice de placa superior o igual al 25% tenían un 62% de implantes sanos, un 15% con mucositis y un 23% con PI. Sin embargo, en aquellos que presentaban un índice de placa menor del 25% los porcentajes eran de 83%, 12% y 5% respectivamente. Por otra parte, la prevalencia de PI y mucositis era mayor en la región anterior mandibular. Estos resultados coinciden con lo publicado anteriormente (73,74).

También se ha demostrado que el consumo diario de alcohol (> 10g/día) podría inducir mayor pérdida ósea marginal alrededor de los implantes, especialmente si va acompañado de tabaquismo (75).

La diabetes, y concretamente un mal control de esta enfermedad metabólica, se ha asociado a la PI: el riesgo de padecer esta complicación en diabéticos sería 3 veces mayor que en pacientes sanos (76,77).

Interleukinas como IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12 y sus receptores podrían jugar un papel importante en la respuesta inflamatoria del paciente. Sin embargo, no se han encontrado asociaciones significativas entre los polimorfismos de los genes que regulan dichas interleukinas y el riesgo de padecer enfermedades periimplantarias. Parecen ser necesarios estudios con muestras más amplias (42,78).

2. Factores de riesgo relacionados con la prótesis

Como se ha mencionado anteriormente, el acúmulo de placa es un factor de riesgo para la mucositis y la PI. Esta variable puede estar asociada al diseño de la prótesis, ya que un difícil acceso a la higiene alrededor de los implantes puede producir inflamación. Serino y Ström (79) fueron los primeros en mostrar que un correcto diseño de la prótesis que facilite la eliminación de la placa bacteriana (figura 8) tiene un efecto positivo sobre la salud del implante. En los implantes con prótesis que facilitaban la higiene, la prevalencia de PI fue de un 4%, mientras que en implantes con prótesis inadecuadas el porcentaje de PI era de un 48%. También se ha sugerido que un ángulo de emergencia de la prótesis superior a 30° es un factor de riesgo para la PI, probablemente porque dificulta la higiene (Figura 9) (80).

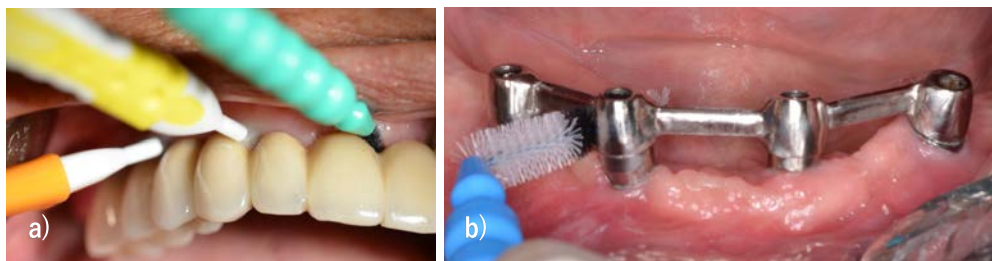


Figura 8. Prótesis fácilmente higienizables. Es importante diseñar las prótesis de modo que permitan el acceso de cepillos interdenciales u otros dispositivos, tanto bajo las coronas protésicas (a) como alrededor de retenedores tipo barras (b).

Además del acúmulo de placa, otra variable importante a tener en cuenta es la inclusión o no de los pacientes con implantes en programas de mantenimiento periimplantario (figura 10). Una publicación del año 2010 evaluó el porcentaje de supervivencia y la pérdida ósea marginal tras 10 años en pacientes con o sin historia de enfermedad periodontal (60). Su conclusión fue que los antecedentes de enfermedad periodontal se asociaban a una menor supervivencia y una mayor pérdida ósea marginal. Otro hallazgo

muy interesante de esta publicación fue que los pacientes que no habían acudido a las visitas de mantenimiento tenían resultados peores (menor tasa de supervivencia y mayor pérdida ósea) que aquellos pacientes con antecedentes de periodontitis que visitaban regularmente su dentista. Rinke y colaboradores (81), por su parte, encontraron una relación estadísticamente significativa entre la prevalencia de PI, el consumo de tabaco y una falta de mantenimiento periodontal. Así, resulta evidente que un buen programa de mantenimiento periodontal es esencial para la prevención de las enfermedades periimplantarias, tal como lo demuestra otro estudio cuyo objetivo era determinar el riesgo de PI a los 5 años en individuos que originalmente habían sido diagnosticados de mucositis. La incidencia de PI tras 5 años en aquellos pacientes que no recibieron un programa de mantenimiento fue del 43.9% mientras que en los que sí lo recibieron fue del 18% (82,83).

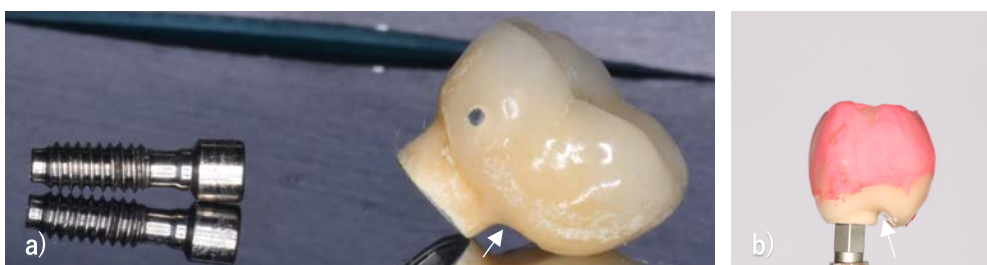


Figura 9. Diferencia entre una corona con un ángulo de emergencia abierto (a) y fácilmente higienizable y una corona con ángulo de emergencia cerrado (b). (imagen b cedida por Marta García-García)



Figura 10. Prótesis híbrida inferior antes (a) y después (b) del mantenimiento.

El exceso de cemento en restauraciones cementadas también se ha asociado a la PI (figura 11). Los restos de cemento no eliminados correctamente parecen propiciar una respuesta inflamatoria de los tejidos periimplantarios, bien sea como reacción a cuerpo extraño, bien sea por la colonización bacteriana del cemento (84–86).

La falta de un buen ajuste marginal de la prótesis (figura 12), pese a no estar descrito en la literatura, parece ser, según la experiencia clínica, otro factor de riesgo de la PI. A pesar de no ser una variable principal de la investigación, el estudio publicado por Saaby y colaboradores (71) indicó que el 12% de los implantes estudiados tenían un mal ajuste marginal y del total de implantes, el 68% presentaban sangrado y/o supuración al sondaje y el 58% profundidades de sondaje superiores a 5mm.

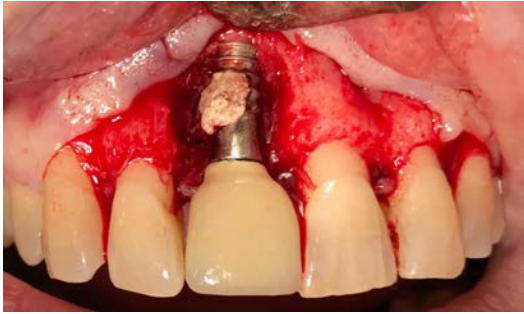


Figura 11. Resto de cemento inicial que promueve el acumulo de placa y la destrucción ósea (imagen cedida por José Leonardo Caraballo).

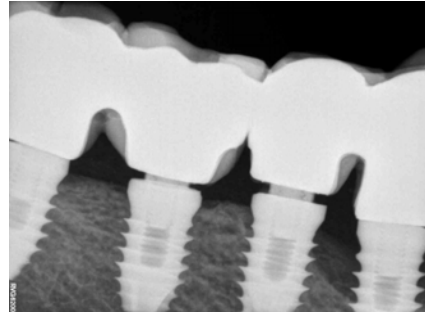


Figura 12. Falta de ajuste marginal de la prótesis (imagen cedida por Miguel Ángel González).

Por último, un artículo reciente concluyó que el tipo de restauración protética parece influir de forma moderada en el pronóstico de los implantes. Se observó un menor porcentaje de éxito en implantes con prótesis removibles retenidas por implantes (93%) que en aquellos con coronas unitarias (97%) o prótesis fijas implantosoportadas (95.5%) (87). Este estudio no encontró diferencias significativas en cuanto a la edad o género de los pacientes, localización de los implantes o si habían sido colocados en hueso nativo o con técnicas de regeneración ósea. Cabe destacar que el menor porcentaje de éxito en los casos de prótesis removibles puede deberse a que los sistemas de retención eran rígidos, como coronas telescópicas. Es probable, que sistemas menos rígidos, como barras u otros anclajes mejoren los resultados. Otro dato relevante de esta publicación es que los casos de prótesis que combinan dientes e implantes parecen tener una menor tasa de complicaciones biológicas en comparación con las restauraciones implantosoportadas (Hazard Ratio: 0.34)

3. Otros factores

Algunos autores sostienen que la PI podría tener como causa inicial factores de origen no bacteriano. La posterior exposición de la superficie del implante sí podría favorecer la colonización bacteriana, y producir una progresión más marcada de la pérdida ósea, como consecuencia de un proceso infeccioso. Los factores que influirían en esa pérdida

ósea marginal inicial son, entre otros: el sustrato óseo sobre el que se coloca el implante (88,89), la conexión protética del implante (89–92), una mala colocación del implante (Figura 13) etc.



Figura 13. Implante colocado en una posición excesivamente lingualizada.

Un artículo reciente se ha referido al concepto de implantes “perdedores de hueso” (89). En este estudio de 208 pacientes con un total de 508 implantes se compararon los cambios de los niveles óseos en ortopantomografías tras la colocación del implante (T0), al colocar la prótesis a los 5 meses de la cirugía (T1), y a los 6 meses y 18 meses de carga funcional. Aquellos implantes que tenían un mayor remodelado óseo entre la colocación de la prótesis y los 6 meses de la carga (superior a 0.44 mm) también mostraban una mayor pérdida ósea marginal a los 18 meses de la carga.

Por otra parte, estudios recientes han sugerido que la superficie de los implantes, una vez expuesta al medio oral, puede ser susceptible de corrosión y esto podría favorecer la colonización bacteriana (93,94).

EPIDEMIOLOGÍA

La aparición de las enfermedades periimplantarias, en forma de mucositis o PI, se considera la complicación más frecuente a largo plazo del tratamiento con implantes dentales. Los estudios señalan que la mucositis afecta al 50-90% de los implantes, mientras que el 20% desarrollan PI tras 5-11 años de función (2)(95).

Se define incidencia como “el número de casos nuevos de enfermedad por unidad periodo de tiempo y persona estudiada” mientras que la prevalencia se describe como “la proporción de individuos de una población que tiene la enfermedad” y se calcula dividiendo el número de personas enfermas entre la población total (96). Además, en Odontología se emplea también el concepto de riesgo, que es la proporción de enfermedad que aparece en un periodo de tiempo.

La incidencia o la prevalencia de una patología se puede calcular siempre y cuando, la definición de dicha patología se mantenga estable. Sin embargo, los signos clínicos que definen la PI no están consensuados y, por tanto, la prevalencia e incidencia estimadas de dicha enfermedad resultan difíciles de calcular.

La PI se diagnostica en aquellos implantes que presenten sangrado al sondaje (“bleeding on probing” o “BOP”) y/o supuración, junto con una pérdida ósea medida mediante radiografías (46,66,97,98). El problema radica en que no siempre se aplica el mismo umbral en cuanto a qué se considera pérdida ósea patológica: (i) >0.4 mm de pérdida desde el momento de la carga (66,98), (ii) pérdida de hueso detectada tras 1 año de colocación de ≥ 1.8 mm (46,97), (iii) ≥ 3 mm de pérdida desde el momento de la conexión del pilar (60), etc. Con estas discrepancias no es extraño encontrar un estudio que constate un riesgo de PI a los 5 años del 1% (99) mientras otro declare un riesgo del 23% a los 10 años (60). Acorde a esto, en una revisión publicada en 2014, Merli y colaboradores (100) concluyeron que el acuerdo entre los examinadores en cuanto al diagnóstico de PI fue calificado como regular. Esto también podría deberse en parte a la definición poco clara de la PI y la mucositis. Este límite confuso entre salud y enfermedad no es algo novedoso, sino que es un tema profundamente tratado en epidemiología. Como Cortés-Martícorena apuntó en el 2005 (101) “la salud es un término de difícil medición; salud y enfermedad son un continuo donde intervienen distintas circunstancias y por tanto la separación entre uno y otro es de difícil definición”.

Un estudio realizado en Brasil y publicado en 2016 sobre 212 pacientes y 578 implantes observó que la mucositis afectaba al 64.6% de los sujetos y el 62.6% de los implantes y la PI al 8.9% de los pacientes y el 7.4% de los implantes (102). En Europa, en un estudio

llevado a cabo en Suiza, también en 2016, se analizaron 218 sujetos con 994 implantes. Se observó que el 48% de los implantes y el 76.6% de los pacientes mostraban profundidades de sondaje iguales o superiores a 4 mm junto con sangrado al sondaje (68).

Por último, un estudio de prevalencia realizado en 2012 en una clínica privada de España, sobre pacientes que seguían un programa de mantenimiento periodontal, analizó 245 sujetos con un total de 964 implantes y mostró que la prevalencia de la PI por paciente era de entre el 12 y el 22% y la mucositis de un 38.8% (28). Años más tarde, en otra muestra de pacientes tratados en una clínica privada de España se observó que, de un total de 56 pacientes y 378 implantes, la prevalencia de mucositis y PI era incluso más alta (103). Se ha de recalcar que este estudio se centraba en pacientes edéntulos que recibieron rehabilitaciones totales implantosoportadas con carga inmediata. Según sus resultados, el 56.9% de los implantes fueron diagnosticados de mucositis y el 14.3% de PI. Prácticamente todos los pacientes tenían algún implante con mucositis o PI. Puede que estas cifras tan elevadas se deban no solo a los criterios diagnósticos seguidos, sino también al hecho de que cada paciente era portador de entre 4 y 6 implantes por arcada, dato que según algunos autores es un factor a tener en cuenta (104).

TRATAMIENTO

Se han propuesto diversas terapias para la resolución de la PI, pero todavía no existe un consenso sobre su tratamiento. El método ideal para la eliminación del biofilm formado sobre la superficie expuesta del implante aún no se ha determinado y, además, puede variar dependiendo de la superficie del implante (105). Los resultados obtenidos en los diferentes estudios muestran algunas mejoras a los 12 meses en la mayoría de los casos, pero también muestran una ausencia de resolución total de la enfermedad, así como numerosos casos de recidiva o progresión (106).

A pesar de los diversos tipos de tratamiento propuestos, existe consenso en que un abordaje no quirúrgico (figura 14a y b) parece ser suficiente para el tratamiento de la mucositis pero no es efectivo en casos de PI (51,107,108). Parece que los casos de PI requieren tratamientos quirúrgicos más agresivos (figura 15 y 16). En general, la literatura ha demostrado que la escasez de publicaciones y la baja calidad de los estudios limitan la aplicabilidad de las opciones de tratamiento.

Una revisión publicada por Heitz-Mayfield y Mombelli (106) en 2014 sobre el tema concluyó que no se podía realizar un metaanálisis debido a la heterogeneidad en las definiciones de PI, las distintas variables de resultados, los diseños de los estudios y la definición de “caso resuelto”. En 9 de los 32 estudios revisados, el éxito tras el tratamiento a los 12 meses variaba del 0 al 100% de los pacientes y del 75 al 93% de los implantes tratados en otros 2 estudios. Una vez más, se hace evidente el problema de falta de consenso en cuanto a la definición de salud y enfermedad con relación a las patologías perimplantarias (109).

Las enfermedades periimplantarias han sido tradicionalmente comparadas con la periodontitis y la gingivitis y, es por esta razón, que muchas de las modalidades de tratamiento propuestas siguen los mismos principios que la terapia periodontal. No obstante, los resultados parecen ser mucho menos predecibles. Por ejemplo, un tratamiento quirúrgico que incluye desbridamiento y descontaminación de la superficie de los implantes mostró una supervivencia del 100% de éstos a los 12 meses, si bien solo el 47% de los implantes estaban exentos de sangrado al sondaje y, por tanto, exentos de enfermedad (110).

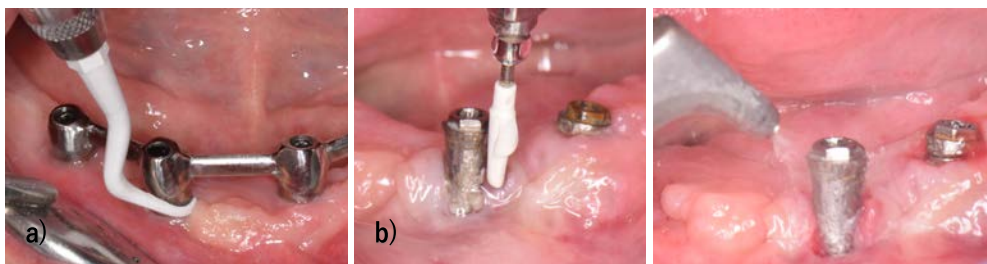


Figura 14. Tratamiento no quirúrgico, a) cureta de plástico, b) ultrasonidos y spray de aire comprimido.

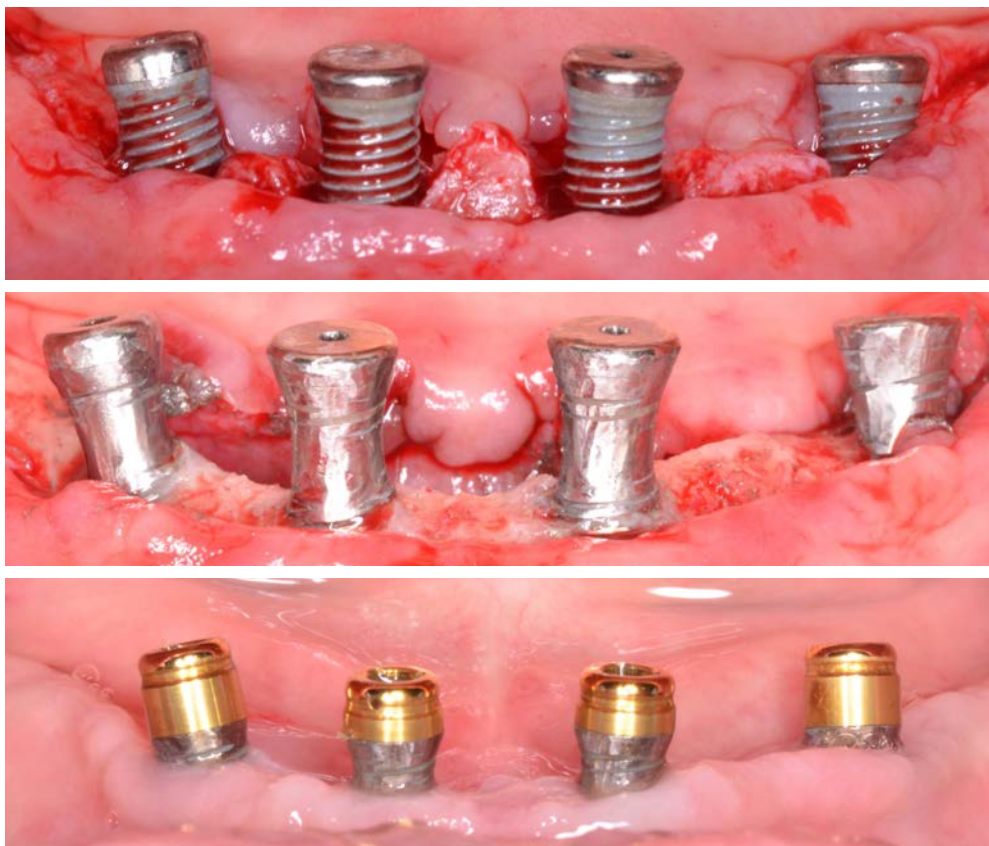


Figura 15. Tratamiento quirúrgico de PI que incluye abordaje resectivo e implantoplastia.

Es de vital importancia tener en cuenta que los implantes y los dientes no son el mismo sustrato y, por lo tanto, los tejidos que los rodean tienen también sus diferencias. En nuestra opinión, esta es la mayor razón por la que PI y periodontitis reaccionan de distinta manera ante un mismo tratamiento: el sustrato es diferente, la enfermedad es diferente y, por lo tanto, es esperable que el resultado ante un mismo tratamiento sea diferente. Sería de gran interés estudiar con más detalle cómo comienza y cómo progresa esta patología alrededor de los implantes, para entender su fisiopatología y poder tratarla.

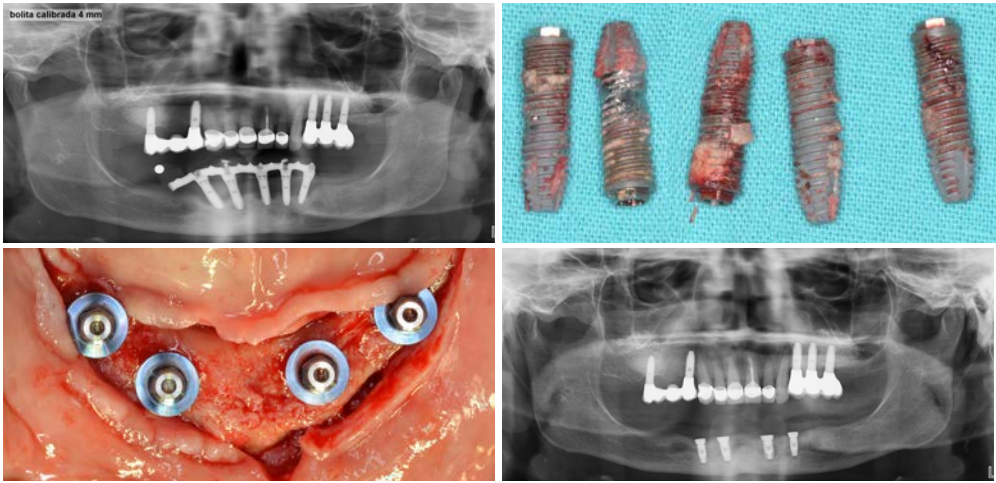


Figura 16. Explantación de implantes con PI y colocación de 4 implantes nuevos.

A continuación, se adjunta una de las múltiples propuestas de actuación existentes en la literatura ante casos de enfermedades periimplantarias teniendo en cuenta el estado del implante (111).

Tabla 1: Índice de Necesidades de Tratamiento Periimplantario (INTPI)			
Valor 0	<ul style="list-style-type: none"> • Sin placa y/o cálculo • Ausencia de signos de inflamación, sangrado al sondaje (BoP) y/o supuración • Sin aumento de la profundidad de sondaje • Ausencia de pérdida ósea radiográfica 		
Valor 1	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia placa y/o cálculo • Ausencia de signos de inflamación, sangrado al sondaje (BoP) y/o supuración • Sin aumento de la profundidad de sondaje • Ausencia de pérdida ósea radiográfica 		
Valor 2	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de signos de inflamación y/o sangrado al sondaje (BoP) y/o supuración • Aumento de la profundidad de sondaje • Ausencia de pérdida ósea radiográfica 	2^a: Prof. Sondaje ≤5 mm	
		2b: Prof. Sondaje >5 mm	2b+: Zona estética 2b++: Zona no estética
Valor 3	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de signos de inflamación y/o sangrado al sondaje (BoP) y/o supuración • Aumento de la profundidad de sondaje • Presencia de pérdida ósea radiográfica 	3^a: Pérdida ósea <25% de longitud del implante	3^a+: Zona estética
			3^a++: Zona no estética
		3b: Pérdida ósea 25%-75% de longitud del implante	3b+: Def. óseo horizontal
			3b++: Def. óseo vertical
			3b+++: Def. óseo combinado
		3c: Pérdida >75% de longitud del implante	3c+: Defecto regenerable
3c++: Defecto no regenerable			
Valor 4	<ul style="list-style-type: none"> • Movilidad del implante • Defecto estético grave • Malposición severa que impide estabilizar la pérdida ósea • Periimplantitis refractaria a tratamiento previo 		

Tabla 2: Niveles terapéuticos de las enfermedades periimplantarias

Abordaje A	Instrucciones en higiene oral	
Abordaje B	Tratamiento mecánico e irrigación submucosa	B1: Aplicación de antibióticos locales
		B2: Prescripción de antibióticos sistémicos
Abordaje C	Acceso quirúrgico con descontaminación de superficie (*) Considerar injerto de tejido conectivo	C1: Implantoplastia
		C2: Técnicas resectivas
		C3: Técnicas regenerativas
Abordaje D	Explantación (*) Considerar injerto de tejido conectivo	D1: Explantación aislada
		D2: Explantación con regeneración

Tabla 3: Valor INTPI

Valor INTPI			Abordaje Terapéutico
Valor 0: Salud A			A
Valor 1: Depósitos			A+B
Valor 2: Inflamación, sangrado (BoP) y/o Supuración Aumento sondaje	2a: Ps≤5mm		A+B
	2b: Ps>5mm	2b+: Zona estética	A+B(1)
		2b++: Zona no estética	A+B+C
Valor 3: Pérdida ósea radiográfica	3a: <25%	3a+: Zona estética	A+B1/B2
		3a++: Zona no estética	A+B(2)+C1/C2*
	3b: 25%-75%	3b+: Defecto óseo horizontal	A+B(2)+C1/C2*
		3b++: Defecto óseo vertical	A+B(2)+C3*
		3b+++: Defecto óseo combinado	A+B(2)+C1/C2+C3*
	3c: >75%	3c+: Defecto óseo regenerable	D2*
3c++: Defecto óseo no regenerable		A+B(2)+C1/C2*	
Valor 4: Fracaso terapéutico			D1/D2*

Tabla 1, 2 y 3. Propuesta de actuación ante la presencia de patologías periimplantarias por Buitrago Vera PJ y Enrile de Rojas FJ (111).

EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO

Si consideramos el denominado “corto plazo” como un período de 5 años y el “largo plazo” como un período a 10 años, en función de la prevalencia estimada de las enfermedades periimplantarias, podemos concluir que el pronóstico general de los implantes dentales se estima como bueno a largo plazo.

Una vez la enfermedad periimplantaria se ha declarado, el pronóstico en el caso de la mucositis es bueno, puesto que se trata de una entidad fácilmente tratable y reversible (33). Sin embargo, este no es el caso de la PI y así lo demuestran numerosos estudios. Un ensayo clínico randomizado reciente analiza el éxito de un tratamiento de periimplantitis a los 5 años (105). Los pacientes recibieron inicialmente un tratamiento no quirúrgico y 4 semanas después se sometieron a un tratamiento quirúrgico de desbridamiento, descontaminación y antibiòticoterapia. Posteriormente, fueron incluidos en un programa de mantenimiento periodontal semestral. Además, previamente al tratamiento de los implantes, todos los pacientes debían tener un buen mantenimiento periodontal general con índices de placa y sangrado inferiores al 25%. Definieron como éxito aquellos casos en los que se dieran todas las siguientes condiciones: i) el implante sobreviviera (es decir, siguiera en boca y en función), ii) tuviera una profundidad de sondaje ≤ 5 mm sin sangrado y/o supuración en ningún punto del implante, y iii) no hubiera progresión de la pérdida ósea. A los 3 años de seguimiento el 75% de los pacientes y el 69% de los implantes cumplieron estos parámetros. Sin embargo, los resultados publicados muestran que solo el 63% de los pacientes y el 53% de los implantes tuvo éxito al final del periodo de seguimiento (5 años). El grupo concluye que “...la mayoría de los implantes y de los pacientes tuvieron éxito”. Si bien es cierto que es más de la mitad, y por tanto puede denominarse “la mayoría”, son unas cifras bajas. De los resultados de este estudio se puede deducir que, a pesar de hacer todo lo posible por tratar la enfermedad, de mantener un bajo nivel general de carga bacteriana y de realizar mantenimientos semestrales, el 47% de los implantes seguían enfermos. Estos resultados son realmente esclarecedores no sólo por sus cifras sino porque se trataba de un estudio multicéntrico en el que se recogieron los datos de dos universidades distintas de Suiza (Universidad de Berna y Universidad de Ginebra) y de una clínica privada de Australia, por lo que sus resultados son extrapolables tanto al ámbito universitario como a la práctica privada.

Un metaanálisis recientemente publicado concluyó que, a pesar de una buena prevención y una terapia de mantenimiento periimplantario cada 5-6 meses, los pacientes no están exentos de complicaciones biológicas (112). Por otro lado, según un estudio de Mir-Marí y colaboradores (28), los pacientes que siguen un mantenimiento

periodontal regular pueden padecer patología periimplantaria, pero tienen un riesgo significativamente menor que los que no lo siguen.

DIFERENCIAS ENTRE ENFERMEDAD PERIODONTAL Y ENFERMEDAD PERIIMPLANTARIA

Las enfermedades mediadas por biofilms, como la gingivitis y la periodontitis, son consideradas como condiciones inflamatorias crónicas comunes en el ser humano (113). Según la Encuesta Nacional de Salud Oral del 2005 (ENSO 2005), un 25.4% de los adultos con edades comprendidas entre 35 y 44 años presentaban bolsas \geq 4-5 mm y el 38% de los individuos de 65-74 años tenían dichos sondajes (114). Estos datos apenas han variado en los últimos 10 años, ya que la encuesta del 2010 (ENSO2010) muestra porcentajes muy similares para estos rangos etarios (115).

De un modo muy genérico, la PI, que ha sido definida como una patología inflamatoria osteolítica que afecta a los implantes dentales (116), se ha presentado como una enfermedad “similar” a la periodontitis. Así pues, es pertinente ver qué diferencias y que similitudes hay entre ambas patologías. Para poder entender y comparar ambas entidades es necesario estudiar previamente la anatomía y estructura tanto del diente y su tejido adyacente como del implante.

1. Diente y periodonto

El diente está rodeado por el periodonto, que comprende: la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar. En la figura 17 se puede ver un dibujo esquemático de un corte histológico que describe la composición del periodonto y sus partes.

La encía libre está formada por todas las estructuras que se encuentran coronales a la unión amelo cementaria. Esta encía posee 3 zonas diferentes de epitelio: el epitelio bucal, que da a la cara externa, el epitelio sulcular que mira hacia el diente sin estar en contacto con él y el epitelio de unión, que sí está en contacto con el diente mediante unión hemidesmosómica (117).

Apicalmente se encuentra el tejido conectivo, que da soporte a los epitelios de unión y bucal y que es el tejido predominante de la encía. Entre las células que se encuentran presentes en el tejido conectivo se encuentran los fibroblastos, mastocitos, macrófagos, granulocitos neutrófilos, linfocitos y plasmocitos (117).

Las fibras del tejido conectivo de la encía y del ligamento periodontal son producidas por los fibroblastos y aunque muchas de estas están distribuidas de manera irregular, la mayoría tienden a formar grupos con una clara orientación. Según su inserción y orientación se pueden dividir en 4 grupos: 1) fibras circulares, 2) fibras dentogingivales, 3) fibras dentoperiósticas y 4) fibras transeptales.

Por último, se encuentra el ligamento periodontal (LPO). Sus componentes principales son: fibras de colágeno (60%), fibroblastos (5%), vasos sanguíneos, nervios y matriz extracelular (35%) (117).

El LPO es un tejido conectivo muy vascularizado y celular que se encuentra rodeando los dientes y uniendo el cemento radicular con la lámina dura del hueso alveolar. Los haces de fibras de colágeno que lo componen se dividen en 4 grupos: 1) fibras de la cresta alveolar, 2) fibras horizontales, 3) fibras oblicuas y 4) fibras apicales. El aporte vascular de la encía proviene de los vasos sanguíneos supraperiósticos y del plexo vascular del LPO (117).

2. Implante y tejido periimplantario

El implante es una estructura, generalmente de titanio de diferentes grados, con una forma macroscópica que simula una raíz dental. En la superficie de los implantes actuales se observan unas espiras que pueden ser de mayor o menor tamaño, más o menos próximas y con mayor o menor angulación, que permiten roscar el implante y estabilizarlo en el momento de su colocación. Microscópicamente, y dependiendo del tratamiento de la superficie, presentan microporosidades de diferentes tamaños que aumentan la superficie de contacto entre hueso e implante y propician la oseointegración durante la cicatrización. La rugosidad de un implante suele variar entre 1 y 2 μm (micras).

A diferencia del diente, el implante no posee cemento radicular ni ligamento periodontal, por lo que no se puede hablar de periodonto, sino de hueso y mucosa periimplantaria.

El hueso periimplantario se encuentra íntimamente unido a la superficie del implante, sin ningún tipo de fibra presente entre las dos superficies. Se trata de un contacto directo con el hueso, a modo de anquilosis.

Una vez el implante ha sido conectado a una prótesis (ya sea a través de un pilar transepitelial intermedio o sin él) se observa, al igual que en el diente, un epitelio de unión y una zona de tejido conectivo. En este caso la banda de adherencia del epitelio de unión es de unos 2 mm de altura y la zona de tejido conectivo comprendida entre el

epitelio de unión y el hueso es de 1 mm o mayor (118). Sin embargo, esta adherencia del epitelio de unión con la superficie del pilar/corona es débil en comparación con el diente y, además, depende del material con el que estén realizados el pilar o la corona protésicos. En cuanto a la composición del tejido conectivo, como se ha mencionado anteriormente, desde el cemento radicular del diente se proyectan una serie de fibras dentogingivales y dentoalveolares en dirección lateral, coronal y apical. Sin embargo, el implante no posee cemento en su superficie, por lo que este tejido se encuentra organizado de manera totalmente diferente. Las fibras colágenas de la mucosa periimplantaria, según un estudio de Berglundh y cols. (119), o bien revisten el periostio en la cresta ósea y se proyectan en todas direcciones paralelas a la superficie del implante, o bien se alinean como haces gruesos que siguen un curso más o menos paralelo a la superficie del hueso.

A diferencia de la encía, la mucosa periimplantaria contiene más colágeno (85%) y menos fibroblastos (1-3%), lo que le confiere las características típicas de un tejido cicatricial rico en colágeno y con pocas células. Su aporte vascular es también diferente. Así como la encía posee un aporte sanguíneo de dos fuentes diferentes, el implante, como hemos dicho, carece de ligamento periodontal y por tanto la única fuente de irrigación sanguínea proviene de los vasos supraperiósticos. Como consecuencia, el compartimento de tejido conectivo supra-alveolar apical al epitelio de unión tiene un limitado aporte vascular (120).

Las diferencias también son evidentes en el hueso que rodea implantes y dientes: mientras que el hueso que rodea el implante tiene una menor vascularización y casi falta de inervación, el hueso que rodea un diente está vascularizado y el LPO se encuentra abundantemente inervado (figura 17) (121).

Como Albrektsson y cols. (122) indican en su publicación del 2014, el complejo periodontal es el resultado de la evolución de millones de años y consiste en una alta diferenciación y especialización de los tejidos mientras que la mucosa periimplantaria es un tejido cicatricial.

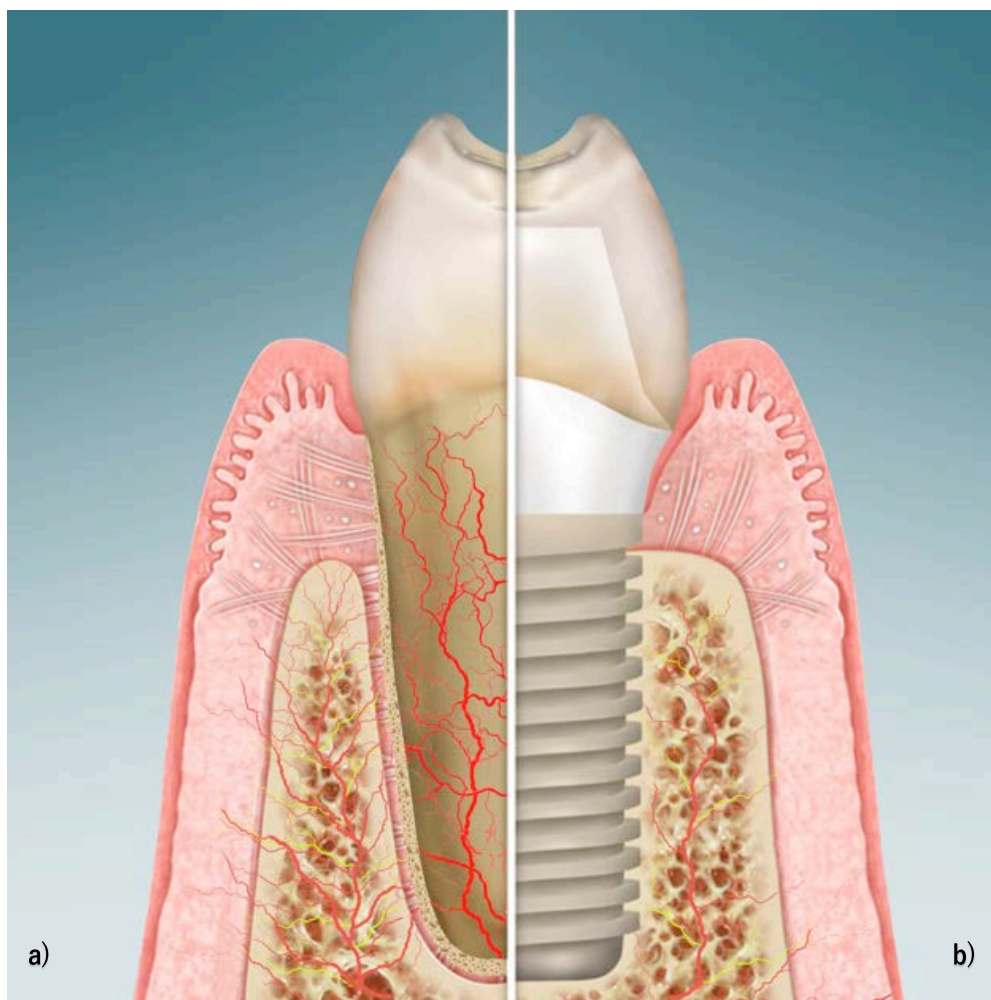


Figura 17. Esquema de la anatomía de un diente y sus estructuras adyacentes (a) versus un implante y su tejido periimplantario (b).

3. Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria asociada a la placa bacteriana acumulada en un diente y provocada por las reacciones inflamatorias e inmunitarias del huésped. El aumento de la carga bacteriana origina la producción de productos de desecho, enzimas y componentes superficiales de las bacterias, que llevan a una irritación de los tejidos adyacentes. Los antígenos microbianos estimulan las células epiteliales del surco gingival para que produzcan citoquinas proinflamatorias y otros mediadores químicos (123). En el inicio de la inflamación se produce un incremento de la permeabilidad del lecho microvascular, de modo que se exudan líquidos y proteínas

hacia los tejidos (líquido crevicular gingival). Posteriormente, se atraen los neutrófilos (sobre todo polimorfonucleares (PMN)) junto con otros leucocitos, como los monocitos macrófagos y linfocitos. La acumulación de PMN libera gran cantidad de enzimas y la infiltración inmunitaria necesita espacio en el periodonto para poder hacer su función, por lo que se destruyen las estructuras adyacentes, capas epiteliales y hueso, con el fin de crear el espacio físico necesario para esos leucocitos infiltrados. El resultado, en consecuencia, es la migración apical del epitelio de unión, la pérdida ósea y un infiltrado inflamatorio que se extiende de manera lateral y apical (123).

4. Periodontitis vs. periimplantitis

Aunque históricamente se han considerado similares, la periodontitis y la PI tienen diferencias evidentes. El grupo de Becker y colaboradores (124) encontró únicamente un pequeño número de similitudes entre ambas patologías en un estudio de perfiles de transcriptoma. Constataron que ambas entidades deberían ser tratadas como enfermedades distintas. Por otra parte, el Séptimo Workshop Europeo en Periodoncia (125) así como el consenso del último Workshop (32) también concluyeron que la PI exhibe características únicas en cuanto a sus parámetros clínicos. Sin embargo, aún se compara a menudo la PI con la periodontitis. Algunos autores afirman que la PI es una respuesta a un cuerpo extraño independiente de la presencia de bacterias (122). Por el contrario, numerosas publicaciones asumen que el desarrollo de la PI, al igual que el desarrollo de la periodontitis, está íntimamente relacionado con la formación de un biofilm constituido por patógenos (126).

Donath, ya en 1992 (121), afirmaba que clínicamente hay diferencias en la reacción del tejido frente a la microbiota entre dientes e implantes. La encía de un diente muestra todos los signos de inflamación, con un aumento del fluido crevicular, mientras que en la mucosa de los implantes este fluido no aumenta.

La literatura actual ha constatado diferencias entre ambas entidades en el infiltrado inflamatorio, que es más acusado en el caso de la PI, y se encuentra en posición más apical. Además, exhibe una mayor cantidad de macrófagos y granulocitos en las bolsas epiteliales y en las zonas perivasculares (4). Estudios en animales han demostrado la capacidad autolimitante de la periodontitis inducida por ligaduras. En efecto, una vez cesa la acumulación de placa bacteriana el proceso es capaz de revertir, cosa que no ocurre en el caso de los implantes (46,127). Se ha observado también que en la PI la inflamación encontrada es más aguda y con presencia de más osteoclastos. Chvartzaid y colaboradores (128) concluyeron que una reacción tisular similar producida en dos situaciones tan diferentes como son diente e implante es bastante improbable. Una

prueba de ello la podemos observar en la distinta forma anatómica de la reabsorción ósea producida alrededor de un implante con PI y la producida alrededor de un diente con periodontitis.

Por otro lado, la variabilidad de los resultados del tratamiento y la agresiva progresión de la PI, en comparación con la periodontitis, lleva a pensar que puede haber alguna diferencia más no considerada hasta ahora. Las diferencias anatómicas son evidentes y pueden ser parte de la respuesta.

La mucosa periimplantaria tiene un menor componente celular y menor aporte sanguíneo, lo que puede dificultar su capacidad defensiva, además de que carece de fibras de colágeno insertadas que confieran una barrera física para el paso de bacterias. Por otra parte, se debe tener en cuenta que la PI es, según algunos autores, una enfermedad infecciosa en la que las bacterias también juegan un papel importante. Estas bacterias crecen formando biofilms, cuya constitución parece estar íntimamente influenciada por las características del sustrato sobre el que se forma (129,130). Puesto que las características de la superficie de los implantes son distintas de las de la superficie dentaria, cabe esperar encontrar ciertas diferencias en la adhesión de los primeros colonizadores y, por tanto, en la formación de un biofilm maduro.

5. Microbiología asociada a los implantes dentales

El biofilm

En el momento en el que un implante es expuesto a la cavidad oral, comienza a cubrirse por una capa de proteínas (mucinas, fosfoproteínas, proteínas ricas en prolina etc.), enzimas y macromoléculas hidrofóbicas que forman la película salival, también denominada película adquirida. Esta película altera la carga y la energía libre de la superficie, lo que incrementa la capacidad de adhesión bacteriana. Posteriormente, la superficie es colonizada por microorganismos, y se forma el llamado biofilm (131,132) (figura 18).

El contenido de la película adquirida juega un papel importante en la selección del tipo de bacterias que se adherirán posteriormente. La saliva y las macromoléculas también pueden adherirse a la superficie de titanio, pero están influenciadas por las propiedades químicas y estructurales de dicha superficie (133). Esta película forma una interfase entre la superficie del implante y los primeros colonizadores, cocos Gram positivo anaerobios facultativos (por ejemplo, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* y el más frecuente *Streptococcus oralis*). Esto crea las condiciones previas para la adhesión de la siguiente

capa, que está compuesta por bacilos Gram positivo, particularmente del género *Actinomyces*. Posteriormente, se adhieren bacterias anaerobias Gram negativo tales como el género *Veillonella* y *fusobacterias*. Seguidamente, se unen el resto de las bacterias periodontopatógenas, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prophyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* o *Tannerella forsythia*, que se asocian, según algunos estudios, a la PI (134).

En los biofilms maduros también se detecta la presencia de células epiteliales, que pueden incluso ser el medio de transporte de ciertos microorganismos (135).

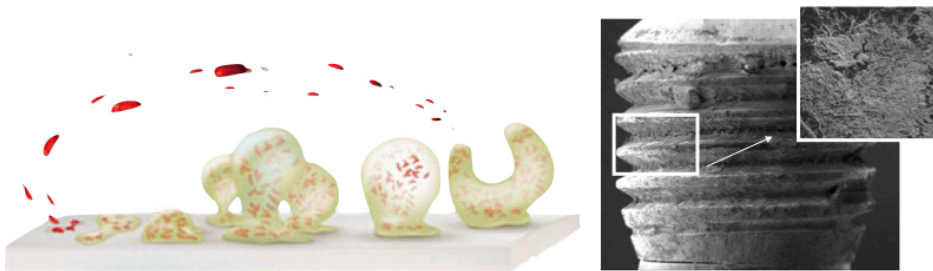


Figura 18. Esquema de las fases de formación del biofilm. Imagen de un pilar del estudio recubierto de biofilm a través del SEM (Microscopio Electrónico de Barrido).

A modo de resumen, podemos dividir en 4 las etapas de formación del biofilm (136,137):

- i **Transporte a la superficie:** el transporte inicial de las bacterias se da a través de sedimentación, movimiento activo bacteriano, flujo líquido o movimiento browniano.
- ii **Adhesión inicial:** adhesión débil y reversible por parte de las bacterias a través de las interacciones con la superficie a una cierta distancia.
- iii **Acoplamiento:** una vez se produce el contacto entre la superficie y la bacteria, bien sea de manera íntima o a través de fimbrias, se establece un anclaje firme entre ambos, gracias a interacciones específicas.
- iv **Colonización o maduración:** el biofilm comienza a madurar con la multiplicación de los microorganismos, que forman microcolonias, y la adhesión de nuevas células.

El proceso de formación del biofilm es complejo, meticuloso y puede verse afectado por diferentes factores tales como el medio ambiente, las propiedades bacterianas y las características de la superficie (composición química, energía libre de superficie (SFE), hidrofobia y topografía). Así, la composición del biofilm depende del sustrato y del

medio, y muestra una fuerte interrelación entre las propiedades físicas y químicas de la superficie y las propiedades biológicas del medioambiente (138).

Rugosidad

La microtopografía de la superficie parece jugar un papel importante en la adhesión bacteriana. Estudios *in vitro* han mostrado una correlación positiva entre la rugosidad de la superficie y la colonización bacteriana (139), así como un estudio piloto que reveló que la formación inicial del biofilm supragingival creado *in vivo* está influenciado por la microtopografía de la superficie (140,141).

La explicación de esto puede estar relacionada con varios factores: i) la adhesión inicial bacteriana comienza preferiblemente en zonas protegidas de las fuerzas de cizallamiento, donde puede pasar de una adhesión reversible a una irreversible, ii) la rugosidad incrementa la superficie de adhesión y iii) una superficie rugosa es más difícil de limpiar completamente, por lo que se propicia la recolonización.

Energía Libre Superficial (SFE)

Una superficie con una mayor SFE tiene mayor propensión a la adhesión bacteriana. Absolom y cols. (142) ya observaron en 1987 una clara relación entre el tipo de proteína contenida en la película salival y la SFE de la superficie colonizada. Pero esta propiedad no solo actúa en la película salival, sino que también tiene su impacto en la colonización bacteriana. En los años 90, se estudió el efecto de la SFE en la formación de placa supra y subgingival alrededor de implantes dentales. Se observó que un substrato con una baja SFE acumulaba significativamente menos placa madura (tanto supra como subgingival), compuesta en su mayoría por cocos y, en menor cantidad, por espiroquetas y organismos móviles (143). Las superficies con una baja SFE se colonizan preferentemente por bacterias con una baja SFE (129). No obstante, cuando se compara la rugosidad con la SFE, parece ser que la rugosidad tiene un mayor impacto en cuanto a la adhesión bacteriana (144).

Composición química

La composición química de la superficie de titanio también parece influenciar la adhesión bacteriana como, por ejemplo: moléculas de dióxido de titanio (TiO₂), la implantación de iones F⁺, la incorporación de antibióticos, etc. Sin embargo, a pesar de que la modificación de la superficie de titanio parece ofrecer buenos resultados *in vitro*, debería ser validada por estudios *in vivo* (129).

Hidrofobia

Según algunos estudios, las superficies hidrófilas tienen un “efecto mecha” en los tejidos líquidos como la sangre, lo que aumenta la adhesión de las proteínas celulares. Esto mismo ocurre con las bacterias, cuya adhesión se ve propiciada por las características hidrófilas de la superficie (145). Por el contrario, un estudio de Schwarz y cols. (140,141) sugiere que la hidrofobia tiene una menor importancia en la formación de la placa supragingival en comparación con la rugosidad. Otros autores (138) mostraron la ausencia de diferencias en cuanto al número total de bacterias adheridas a superficies con diferentes microtopografías. Tampoco hubo diferencias en bacterias cultivadas en saliva humana o en un medio de cultivo, y concluyeron que la hidrofobia tenía una menor importancia que la rugosidad.

Composición bacteriana del biofilm

Se han identificado más de 700 especies procariotas como parte del microbioma oral humano (146). Un huésped sano es capaz de mantener una homeostasis entre la microbiota comensal y los patógenos; sin embargo, si esta interacción que mantiene la homeostasis se pierde, aparece la enfermedad.

En 1998 Socransky y colaboradores (182) ordenaron por clusters los complejos de especies bacterianas existentes en la placa subgingival, Se definieron 5 clusters que son; el rojo, naranja, amarillo, verde y lila. Mas adelante la especie *actinomyces* se separó del cluster lila (Figura 19). Socransky concluyó que las bacterias del cluster rojo se relacionaban con signos clínicos de periodontitis, particularmente con bolsas profundas y sangrado al sondaje.

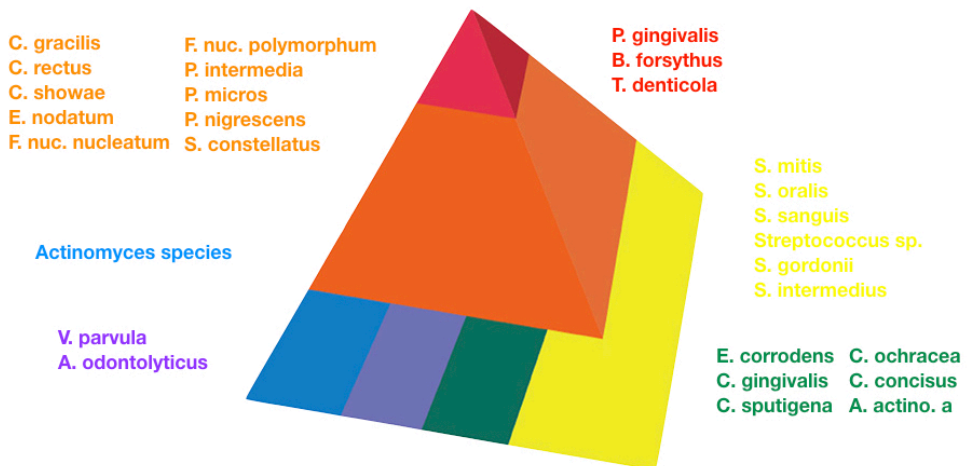


Figura 19. Ejemplo de pirámide de Socransky (182)

Un conocido factor causante del inicio y progresión de las enfermedades periodontales es el aumento en la proporción de bacterias Gram negativo en el microbioma oral (147); por ejemplo, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es considerado como uno de los agentes etiológicos más importantes de la periodontitis agresiva en humanos (148–150).

Una de las bases de datos más importantes existentes hoy en día sobre la microbiota encontrada en el medio oral es la “Human Oral Microbiome Database (HOMD) (<http://www.homd.org/>). Estos microorganismos se clasifican en OTUs (Operational Taxonomic Units) y, según señala la HOMD, pueden diferir entre individuos debido a diferencias en los hábitos dietéticos, el momento de toma de la muestra y la localización geográfica, entre otros factores.

Los primeros estudios que documentaron los microorganismos encontrados en las zonas periimplantarias fueron publicados en el 1983 y 1984 (151,152), donde se estudió la placa obtenida con curetas desde la zona más profunda de la bolsa periimplantaria. Desde entonces, diversos estudios han observado y documentado la colonización primaria que se produce a nivel de los implantes, tanto en pacientes edéntulos (2,153,154) como en pacientes parcialmente desdentados (155–159). En términos generales, los implantes sanos parecen caracterizarse por una gran proporción de células cocoides y una baja proporción de especies anaerobias facultativas y Gram negativo (159). En los implantes con PI se ha encontrado una microbiota muy variada y compleja que incluye la presencia de los principales periodontopatógenos (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum* y *Campylobacter sp*) (159,160). El tipo de edentulismo o la presencia de enfermedad periodontal, entre otros, parecen también influir en las características de la microbiota bacteriana periimplantaria (145,159,161).

En un estudio comparativo de la microbiota entre dientes e implantes llevado a cabo por Eick y cols. (162), se observó que las bacterias históricamente asociadas con la periodontitis se encontraron en el 6.2% - 78.4% de los implantes tras 10 años de función (tabla 1). Cabe destacar que este grupo utilizó como método de análisis la PCR (Protein Chain Reaction) en tiempo real. La limitación principal de esta metodología es que sólo se puede determinar la carga bacteriana de ciertas bacterias. Encontraron una cantidad significativamente superior de *Tannerella forsythia*, *Prevotella micra*, *Fusobacterium nucleatum/necrophorum* y *Campylobacter rectus* en implantes en comparación con dientes (muestras tomadas con puntas de papel insertadas en el surco). Se detectaron *Staphylococcus warnei* en el 36.7% de los implantes y *Staphylococcus aureus* en el 2.2%. El género *Candida* también se detectó de manera frecuente; *C. albicans* en un 24.6% y *C. glabrata* en un 38.5%. De entre las especies aerobias Gram negativo,

Pseudomonas aeruginosa y *Serratia marcensens* nunca fueron identificadas, mientras que *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Acinetobacter baumannii* se encontraron en algún caso (Tabla 2) (162). En aquellos implantes que presentaban inflamación de los tejidos periimplantarios, se observó una mayor cantidad de *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* y *Campylobacter rectus* (162). También se han encontrado *Staphylococcus* en gran cantidad en este estudio de Eick y colaboradores (162), en concreto *S. hominis* y *S. warneri*; éste último asociado de manera estrecha a implantes con inflamación de los tejidos periimplantarios.

Especies	Implantes		Dientes		Diferencia implante-diente <i>p</i>
	Positivo (%)	En gran cantidad (%)	Positivo (%)	En gran cantidad (%)	
<i>Aggegatibacter actinomycetemcomitans</i>	6.2	2.8	6.7	4.6	0.104
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	16.9	9.6	14.8	8.1	0.326
<i>Prevotella intermedia</i>	12.7	3.2	10.1	3.2	0.379
<i>Tannerella forsythia</i>	34.9	12.1	27.4	9.7	0.005
<i>Treponema denticola</i>	23.6	5.8	18.3	6.9	0.051
<i>Parvimonas micra</i>	55.6	16.5	41.6	11.5	<0.001
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	78.4	30.0	72.2	29.0	0.016
<i>Campylobacter rectus</i>	43.1	19.4	37.5	13.6	0.015
<i>Eikenella corrodens</i>	39.1	4.4	40.2	5.7	0.450
<i>Eubacterium nodatum</i>	16.9	0.6	16.2	0	0.313
<i>Capnocytophaga sp.</i>	60.1	19.5	62.3	20.1	0.086
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.2	0	3.4	0	0.403
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5.8	0	6.7	0	0.394
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7.1	0	8.5	0	0.246
<i>Staphylococcus hominis</i>	26.0	0.2	25.8	0.6	0.985
<i>Staphylococcus warneri</i>	36.7	0.6	40.1	0.8	0.246
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	0	0.2	0	0.317
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	14.7	0	12.4	0	0.219
<i>Escherichia coli</i>	0.6	0	0.6	0	0.705
<i>Proteus mirabilis</i>	0.4	0	0	0	0.157
<i>Citrobacter freundii/koseri</i>	43.8	0.2	46.6	0.2	0.206

Especies	Implantes		Dientes		Diferencia implante-diente p
	Positivo (%)	En gran cantidad (%)	Positivo (%)	En gran cantidad (%)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4.2	0	3.2	0	0.336
<i>Klebsiella oxytoca</i>	61.7	13.3	63.7	37.8	0.316
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0.8	0.4	0.8	0.6	0.705
<i>Enterobacter cloacaelaerogenes</i>	0.4	0	0.6	0	0.317
<i>Enterobacter intermedium</i>	77.6	13.5	78.9	10.3	0.901
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	0	0	1.000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	1.000
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.2	0	0.2	0	1.000
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1.8	0	1.6	0	0.480
<i>Candida albicans</i>	24.6	5.9	26.4	4.2	0.839
<i>Candida glabrata</i>	38.5	13.2	37.9	13.6	0.432
<i>Candida parapsilosis</i>	3.4	1.8	3.2	1.2	0.233
<i>Candida tropicalis</i>	0.8	0.6	0.6	0.6	1.000

Tabla 2. Datos obtenidos de los resultados de Eick y cols. 2016 (162).

Se ha sugerido que existen ciertas especies con predilección por la superficie de titanio. En un estudio *in vitro*, *Streptococcus mutans* se adherían más frecuentemente a superficies de titanio que a superficies de hidroxiapatita, y, por el contrario, *Actinomyces naeslundii* mostraban una mayor afinidad por la hidroxiapatita (163).

Las tablas 3 y 4 representan la microbiota encontrada por otros autores sobre implantes y/o dientes mediante diferentes métodos de estudio (158,161,164–166).

Bacteria	Gerber y cols. 2006 (164) <i>Distribución media sobre la superficie de implante (%)</i>	Buchmann y cols. 2002 (161) <i>Prevalencia entre flora cultivada (%)</i>	Keller y cols. 1998 (165) <i>Frecuencia de bacterias encontradas sobre implantes con PPD 1-3mm (%)</i> (Estudio de 14 bacterias)	Van Winkelhoff y cols. 2000 (158) <i>Porcentaje de implantes con bacterias específicas detectadas al mes de colocación</i>
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	1.5			
<i>Actinomyces israelii</i>	1.9	68.8		
<i>Actinomyces naeslundii 1</i>	4.1		0	
<i>Actinomyces naeslundii 2</i>	2.9			
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	3.3		54	
<i>Veillonella parvula</i>	7.6	43.8		
<i>Streptococcus gordonii</i>	0.9			
<i>Streptococcus intermedius</i>	1	25.4		
<i>Streptococcus mitis</i>	6.5			
<i>Streptococcus oralis</i>	1.7			
<i>Streptococcus sanguis</i>	0.9	24.1		
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomytans</i>	10.7	0		
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	3.7			
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	0.6			
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	2.6			
<i>Eikenella corrodens</i>	3.4		0	
<i>Capnocytophaga gracilis</i>	1.7			
<i>Capnocytophaga rectus</i>	0.6			
<i>Capnocytophaga showae</i>	1.4			
<i>Eubacterium nodatum</i>	0.4			
<i>Fusobacterium nucleatum</i>		87.5		85
<i>Fusobacterium nucleatum ssp. Nucleatum</i>	2.4			
<i>Fusobacterium nucleatum ssp. Polymorphum</i>	3.5			
<i>Fusobacterium nucleatum ssp. Vicentii</i>	3.4			
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	2.4			

Bacteria	Gerber y cols. 2006 (164)	Buchmann y cols. 2002 (161)	Keller y cols. 1998 (165)	Van Winkelhoff y cols. 2000 (158)
<i>Micromonas micros</i>	2			
<i>Prevotella intermedia</i>	5.4	56.3	23	60
<i>Prevotella nigrescens</i>	2.7			
<i>Streptococcus constellatus</i>	1.7			
<i>Tannerella forsythia</i>	1.3	62.5	7.5	20
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4.2	81.3	0	
<i>Treponema denticola</i>	2.5			
<i>Eubacterium saburreum</i>	0.3			
<i>Gemella morbillorum</i>	8.6			
<i>Leptotrichia buccalis</i>	7.2			
<i>Micromonas micros</i>		68.8		
<i>Neisseria mucosa</i>	7.6			
<i>Propionibacterium acnes</i>	0.2			
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0.6			
<i>Streptococcus anginosus</i>	2.1	25.2		
<i>Selenomonas noxia</i>	3.7			
<i>Treponema socranskii</i>	0.3			
<i>Prevotella buccae</i>		31.3		
<i>Eubacterium lentum</i>		56.3		
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>		26.7		
<i>Selenomonas spp.</i>			0	
<i>Actinomices viscosus</i>			0	
<i>Prevotella mel. Group</i>			0	
<i>Veionella spp.</i>			30	
<i>Capnocytophaga spp.</i>			23	
<i>Campylobacter rectus</i>			7.5	
<i>Fusobacterium spp.</i>			54	
<i>P. micros</i>				90

Tabla 3. Tabla comparativa de la microbiota encontrada por diferentes estudios mediante checkboard DNA-DNA hibridization y diferentes cultivos

Implantes PI	Implantes Sanos	Dientes Periodontales
<i>Porphyromonas</i> sp	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Prevotella iralis</i>
<i>Prevotella tanneriae</i>	<i>Streptococcus uncultured</i>	<i>Prevotella uncultured</i>
<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Capnocytophaga</i>
<i>Prevotella oris</i>	<i>Streptococcus oral clone (AB538417)</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Prevotella genomsp.</i>	<i>Streptococcus oral clone (AB538414)</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Prevotella oulorum</i>	<i>Veillonella uncultured</i>	<i>Streptococcus cristatus</i>
<i>Prevotella</i> sp.	<i>Veillonella parvula</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Veillonella dispar</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Bacteroidetes bacterium (Oral Taxon 274')</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Granulicatella adiacens</i>
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Cardiobacterium valvarum</i>	<i>Veillonella sp. (AB538427)</i>
<i>Capnocytophaga granulosa</i>		<i>Propionibacterium</i> sp.
<i>Chloroflexi genomsp.</i>		<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Synergistetes bacterium</i>		<i>Campylobacter gracilis</i>
<i>Streptococcus</i> sp.		<i>Cardiobacterium valvarum</i>
<i>Streptococcus mitis</i>		<i>Phylum sp. (AB538425)</i>
<i>Streptococcus gordonii</i>		
<i>Streptococcus cristatus</i>		
<i>Streptococcus intermedius</i>		
<i>Streptococcus salivarius</i>		
<i>Streptococcus sanguis</i>		
<i>Gemella haemolysans</i>		
<i>Granulicatella adiacens</i>		
<i>Selenomonas noxia</i>		
<i>Dialister pneumosintes</i>		
<i>Dialister</i> sp.		
<i>Veillonella dispar</i>		
<i>Propionibacterium</i>		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>		
<i>Peptoestreptococcus stomatis</i>		
<i>Eubacterium</i> sp.		
<i>Parvimonas</i> sp.		
<i>Parvimonas micra</i>		
<i>Neiseria flava</i>		
<i>Cardiobacterium valvarum</i>		
<i>Uncultured</i>		

Tabla 4. Microbiota encontrada por Tatsuro Koyanagi y cols. 2010 mediante 16S rRNA clone library (166).

MARCO TEÓRICO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

Debido al alto riesgo de complicaciones biológicas de los implantes -la mucositis y la PI- es interesante revisar la literatura para ver qué se sabe y qué se ignora respecto a la microbiota y las posibles diferencias en la formación del biofilm.

Si analizamos los artículos disponibles sobre el biofilm formado sobre la superficie de los implantes, en la mayoría de los casos, la muestra bacteriana fue recogida con métodos (por ejemplo, curetas de plástico) que destruyen la estructura tridimensional de dicha película (55). Este es uno de los principales inconvenientes de los estudios *in vivo* ya que, por motivos éticos, no se puede retirar el implante con su respectivo biofilm (119), y aún en el caso de que se retire el implante, no se conserva la estructura del biofilm. Una alternativa interesante consiste en la colocación de placas de titanio sobre férulas de acrílico (figura 20a), lo que permite el estudio del biofilm íntegro (14,15,127). Sin embargo, este último método no es totalmente extrapolable a una situación real, pues no es posible simular el surco periimplantario y su componente subgingival (teóricamente más anaerobio). Por esta razón, diversos autores han estudiado el biofilm formado sobre la superficie de aditamentos o pilares colocados sobre implantes osteointegrados (figura 20b,c) (16,143). Estos pilares, en su mayoría, son mecanizados o presentan alguna rugosidad en su superficie, no superior a $0.9 \mu\text{m}$ (14,16), pero en ningún caso tienen una superficie y morfología micro y macroscópica equivalente a un implante dental. Por lo tanto, no simulan adecuadamente la acumulación de biofilm sobre un implante expuesto al medio oral

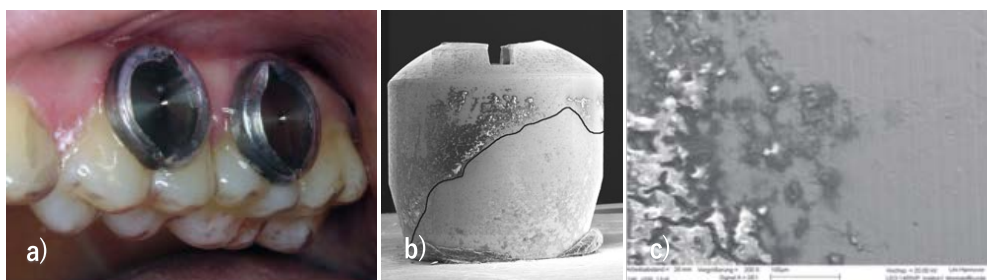


Figura 20. Instrumental para la recogida de la muestra de los estudios previamente mencionados de Bürgers y cols. (14) (a), de Heuer y cols. (16) (b), de Elter y cols. (17,18) (c)

Por otro lado, en cuanto a la capacidad de proliferación del biofilm sobre los implantes dentales, los estudios *in vivo* que simulan la situación real con mayor precisión, es decir, aquellos que utilizan pilares, solamente observan el biofilm formado a los 14 días, mientras que aquellos que utilizan discos de titanio sobre placas de acrílico analizan el

biofilm a las 12 o 24 horas (14,167). También existen estudios *in vitro* sobre la formación de biofilm sobre diferentes superficies que toman entre 1 y 120 horas como tiempo estimado (168), si bien son más frecuentes los de 24-48 horas (169,170). El tiempo estimado para la formación de un biofilm maduro es de aproximadamente 14 días (171).

En cuanto a la microbiota relacionada con los implantes dentales, investigaciones previas sugieren que la PI se asemeja al proceso de progresión de la periodontitis (1) y que las bacterias que colonizan la superficie de los implantes son similares a aquellas que se encuentran colonizando los dientes con enfermedad periodontal (134,164). Sin embargo, son cada vez más los estudios que se posicionan en contra de esta hipótesis, que postula que los dientes actúan como reservorio, puesto que se encuentran cada vez más bacterias no descritas previamente colonizando implantes sanos y/o enfermos (11).

Las bacterias se adhieren y colonizan la superficie, formando el biofilm, y dicha formación depende no solamente de las características de las bacterias, sino también de las características de la superficie sobre la que se adhieren. La topografía macro y microscópica de un diente es muy diferente a la de un implante, al igual que la rugosidad, la hidrofobia o la tensión superficial y, puesto que estas características parecen ser factores importantes en la formación de biofilm (133,172) cabe esperar que el biofilm formado sobre implantes y sobre dientes sea distinto y, por tanto, su composición bacteriana también.

Actualmente, el empleo de nuevas técnicas moleculares, con un enfoque más abierto y global, revela una división significativa entre las comunidades bacterianas asociadas a los dientes y a los implantes. Varios estudios describen diferencias entre la microbiota subgingival y la existente alrededor de los implantes. De hecho, como ya se ha expuesto, se han observado sobre implantes microorganismos que no habían sido identificados previamente en periodontitis (9,173). No obstante, al igual que ocurría con los estudios sobre biofilm, los estudios sobre la microbiota que coloniza los implantes se realizan con sistemas que presentan limitaciones. Los estudios *in vivo* que analizan las bacterias que colonizan los implantes dentales toman la muestra de los tejidos blandos adyacentes, del fluido crevicular o raspando el implante mediante curetas (164,166) y la microbiota encontrada difiere mucho entre unos y otros.

Sería idóneo observar la microbiota que se encuentra adherida a la superficie del implante en su totalidad (figura 21). No solo aquella que se encuentra alrededor y se puede obtener mediante curetas, sino también aquella que está adherida hasta en las capas más profundas y en contacto con el titanio.

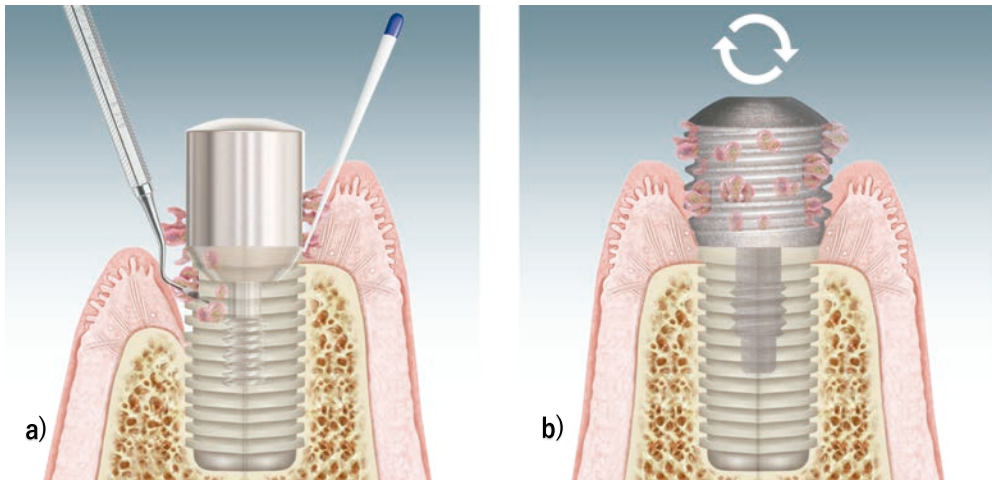


Figura 21. Imagen comparativa de técnicas utilizadas en otros estudios (curetes o puntas de papel) (a) y la técnica propuesta en nuestros estudios (b)

Como resumen de esta revisión, las enfermedades periimplantarias, y concretamente la PI, tienen una alta prevalencia y un tratamiento complejo y poco predecible. Se trata de una patología multifactorial en la que, a pesar de que su etiopatogenia es discutible, está constatado que las bacterias juegan un papel fundamental, por lo menos en su progresión. La literatura es extensa en cuanto a posibles tratamientos, todos ellos sin resultados definitivos a largo plazo, y es posible que actualmente la comunidad científica no sea capaz de encontrar el tratamiento ideal porque aún no se conoce realmente qué ocurre durante el proceso de la PI. Puesto que las bacterias colonizadoras de la superficie, una vez expuesta, son las causantes de esta progresión, es de vital importancia conocer cómo se organizan estas bacterias en esa superficie, así como conocer cuáles son. Como ha quedado dicho, la literatura es abundante en cuanto a la prevalencia y el tratamiento de esta enfermedad, pero es escasa en cuanto al estudio in vivo de la microbiota que coloniza los implantes dentales y su organización en biofilms.

Por todo ello se realizaron los estudios que componen esta tesis y que se presentan a continuación. Pretenden describir qué ocurre sobre estas superficies una vez son expuestas al medio bucal y explicar la microbiota que las coloniza.

V OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo principal

- Analizar la estructura y composición del biofilm oral formado a los 14 días sobre un pilar de cicatrización que simula un implante dental (con espiras y superficie rugosa) expuesto a la cavidad bucal.

Objetivos específicos

- Determinar la cantidad y distribución del biofilm formado a los 14 días comparando su área supra y subgingival, así como sus caras vestibular y lingual/palatina.
- Identificar las bacterias presentes en la superficie de los pilares tras 14 días en boca, a través de un método de metagenómica (pirosecuenciación).

Objetivo secundario

- Comparar la microbiota hallada en pacientes con y sin antecedentes de periodontitis.

Hipótesis principal

- Tras 14 días de exposición a la cavidad bucal, la mayoría de la superficie de los implantes está recubierta por un biofilm maduro y espeso compuesto por una microbiota heterogénea con predominio de especies Gram negativo.

Hipótesis operativas

- La porción supragingival y vestibular del pilar experimental presenta un mayor grado de recubrimiento y espesor de biofilm en comparación con la zona subgingival y lingual.
- La microbiota periimplantaria presente sobre un implante dental expuesto a la cavidad bucal está compuesta por más de 80 especies bacterianas y tiene un predominio de especies Gram negativo.

Hipótesis secundaria

- La cantidad y distribución del biofilm formado sobre un implante tras 14 días expuesto al medio oral no difiere entre pacientes con y sin antecedentes de periodontitis.

VI APORTACIONES
DE LA
DOCTORANDA

APORTACIONES DE LA DOCTORANDA

El trabajo hecho por la doctoranda para la realización de la presente tesis doctoral como compendio de artículos ha sido el siguiente:

1. Confección y diseño de los protocolos de ambos estudios y obtención de la ayuda económica para estudiantes de doctorado y postgrado de la Facultat d'Odontologia de la Universitat de Barcelona.
2. Participación en el diseño macroscópico del pilar del estudio.
3. Diseño y confección de los viales de transporte para los pilares.
4. Recogida de datos de todos los sujetos incluidos en el estudio, colocación y retirada del pilar, así como su transporte al lugar que correspondiera.
5. Participación en el proceso de laboratorio del estudio I.
6. Participación en la obtención de imágenes con microscopía electrónica de barrido del estudio II.
7. Colaboración en la interpretación del análisis estadístico de los resultados.
8. Redacción de los manuscritos publicados.
9. Redacción de la presente tesis doctoral como compendio de artículos.

VII PRESENTACIÓN DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS

1. ESTUDIO I

MICROBIOTA ANALYSIS OF BIOFILMS ON EXPERIMENTAL ABUTMENTS MIMICKING DENTAL IMPLANTS: AN IN VIVO MODEL

- Autores: *Cortés-Acha B, Figueiredo R, Seminago R, Roig FJ, Llorens C, Valmaseda-Castellón E.*
 - Título: *Microbiota Analysis of Biofilms on Experimental Abutments Mimicking Dental Implants: An in Vivo Model*
 - Revista: *Journal of Periodontology*
 - Factor de impacto: *3.392*
 - Posición JCR (Dentistry, Oral Surgery and Medicine): *9/91*
 - Referencia completa: *Cortés-Acha B, Figueiredo R, Seminago R, Roig FJ, Llorens C, Valmaseda-Castellón E. Microbiota analysis of biofilms on experimental abutments mimicking dental implants: An in vivo model. J Periodontol. 2017;11:1-20.*
 - Doi: *10.1902/jop.2017.170051*
-

Fecha de envío: 21 de Enero 2017

Fecha de aceptación: 28 de Abril 2017

Fecha de publicación: Octubre 2017

Objetivo

Identificar la microbiota que rodea la superficie de un implante dental expuesto en pacientes con y sin antecedentes de enfermedad periodontal a través de un método de pirosecuenciación.

Material y método

Se efectuó un estudio experimental no randomizado que incluyó a 10 pacientes (6 hombres y 4 mujeres con una media de edad de 60.7 años) con al menos un implante oseointegrado de conexión externa sin patología periimplantaria. Cinco pacientes tenían historia de enfermedad periodontal ("grupo periodontitis", GP) y cinco eran periodontalmente sanos ("grupo sano", GS).

Los pacientes se clasificaron como periodontalmente sanos (GS) cuando no presentaban pérdida de inserción (AL) ni pérdida ósea (PO) medida a través de radiografías periapicales, tenían profundidades de sondaje (PS) inferiores a 4mm y no presentaban sangrado al sondaje (BOP) en al menos 70% de las localizaciones. Se consideraba que tenían antecedentes de periodontitis (GP) si presentaban $AL \geq 1\text{mm}$ en más del 30% de las localizaciones con evidencia de BOP. Todos los pacientes del GP habrían sido tratados previamente y estaban controlados en el momento de inclusión en el estudio. Todos los pacientes cumplían los siguientes criterios de inclusión: 1) edad comprendida en 18 y 90 años; 2) estadio ASA (clasificación de la Asociación Americana de Anestesiólogos) inferior o igual a 3; 3) llevar al menos un implante oseointegrado de conexión externa; 4) que no tuvieran aún colocada la prótesis final; 5) altura mínima gingival de 2mm medida desde el cuello del implante hasta el margen gingival; 6) suficiente capacidad intelectual para comprender el estudio y firmar el consentimiento. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC, protocolo número 05/14) del Hospital Odontológico de la Universitat de Barcelona, y se cumplieron los requisitos estipulados en la declaración de Helsinki de 1975 y revisada en 2013. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

Los pacientes se excluyeron si se daba una de las siguientes situaciones; 1) presencia de gingivitis generalizada con BOP en más del 30% de las localizaciones; 2) periodontitis no controlada ($PS > 5\text{mm}$ con sangrado y/o supuración); 3) presencia de enfermedades periimplantarias (implantes con sangrado y/o supuración y al menos una localización con evidencia radiográfica de PO de $\geq 2\text{mm}$); 4) haber recibido cualquier tratamiento periodontal durante los 30 días previos al estudio; 5) haber recibido antibióticos o colutorios antisépticos (bisbiguanidas, sales de amonio cuaternario y aceites esenciales) durante los 30 días previos al estudio (figura 22).

Recogida de datos

Un único investigador (BCA) reclutó los pacientes entre Febrero y Septiembre del 2014 en el Hospital Odontológico de la Universitat de Barcelona (Barcelona, España) y efectuó todos los registros. Los datos recogidos fueron edad, género, estado de salud basado en la clasificación ASA (American Society of Anesthesiologists), patologías sistémicas, medicación, hábito tabáquico (número de cigarrillos al día), enfermedad periodontal (periodontograma que incluyó el registro del profundidad de sondaje, de las recesiones, del sangrado y supuración), y las siguientes variables del implante: 1) fecha de colocación; 2) diámetro; 3) longitud; 4) posición; 5) distancia con dientes/implantes adyacentes; 6) anchura de banda de encía queratinizada; 7) tipo de prótesis; 8) índice de placa de Mombelli (PPI)(174); 9) índice de sangrado de Mombelli (PSBI) (174); 10) supuración; 11) PS periimplantario y 12) PO. La PO se midió mediante radiografías periapicales.

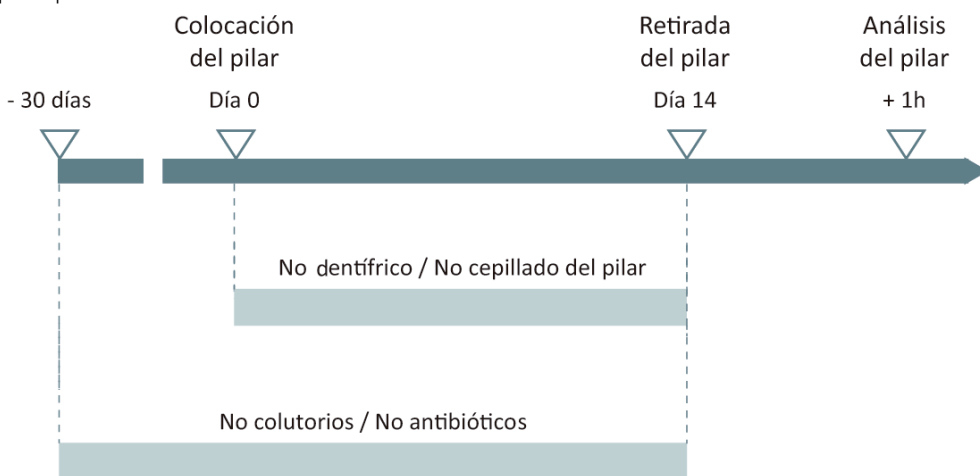


Figura 22. Línea temporal del estudio.

Recogida de muestra y aislamiento de ADN

Los pilares usados fueron fabricados específicamente para este estudio por lo que se diseñaron de tal manera que tuvieran la misma forma macroscópica y microscópica que un implante dental (figura 23). Una vez colocado el pilar, se instruyó a los pacientes para que no lo cepillaran, aunque si que podían higienizar el resto de la boca/dientes, sin usar pasta dentífrica ni colutorios. Después de 14 días se colocó el pilar en tubo estéril cerrado, enroscado en un análogo que se encontraba en el interior (figura 24). Se transportó inmediatamente al laboratorio en una nevera a 4°C en menos de una hora. Todos los pacientes posteriormente recibieron sus prótesis definitivas y fueron incluidos en un programa de mantenimiento periimplantario.

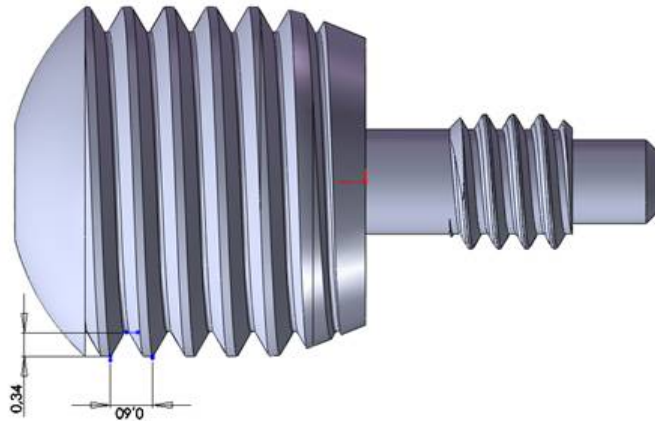


Figura 23. Esquema del pilar diseñado para estos estudios por Mozo-Grau.

Una vez en el laboratorio, se colocó el pilar en un tubo de microcentrifugado de 1.5ml y se congeló a -80°C . Posteriormente, para realizar el análisis, se aclaró el pilar con solución salina PBS y fue pasado por el vortex durante 5 minutos. Todo el ADN fue purificado con el Purification Kit (QjAamp DNA minikit, Qjagen, Hilden, Alemania) y la cantidad de ADN extraído fue calculada usando el sistema Qubit (Qubit system, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.).

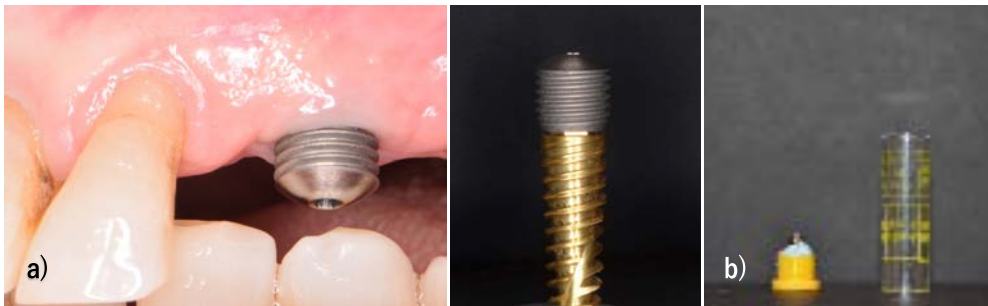


Figura 24. a) Pilar colocado en boca, b) tubo de envío del pilar con un análogo fijado en su interior.

Análisis estadístico

Se amplificaron las regiones variables V1, V2, V3, V4 y V5 del gen ribosomal 16S ARN. Una vez amplificadas, se multiplicaron con un sistema de PCR (FastStar High Fidelity PCR System, Roche, Manheim, Alemania) y se secuenciaron con un kit de secuenciación de titanio (GS Junior titanium sequencing kit, Roche, Indianapolis, EE. UU.).

Las Polimerase Chain Reactions (PCR) para los primers V1-V3 y V5-V3 se prepararon a una temperatura templada de 56°C y 50°C respectivamente. Se realizaron y agruparon dos réplicas de PCR por cada muestra. La librería de amplicón se limpió con un sistema de purificación de PCR según las instrucciones del fabricante (Agencount AMPure

beads, Beckman Coulter, Brea, EE. UU.). Las etiquetas codificadas de la secuenciación de ADN de las muestras se desarrollaron en una plataforma de pirosecuenciación (GS Junior Platform, Roche Applied Science, Indianápolis, EE. UU.). Los *primers* utilizados para la amplificación del gen 16S rARN y para la introducción de identificadores múltiples de identificación de amplicones están disponibles en la página web del National Institute of Health Human Microbiome Project (175).

Fases de la pirosecuenciación

Una vez obtenida la muestra de ADN de las diferentes cepas bacterianas depositadas en los pilares, se llevó a cabo la amplificación de las regiones V1-V5 del gen 16S mediante la técnica de la PCR, desarrollada en 1983 por Mullis y cols. (176).

La técnica de PCR tiene tres fases. La primera es una desnaturalización de ADN, con lo que se consigue separar las dos cadenas; la segunda es la de annealing, donde unos *primers* o cebadores se hibridan con su secuencia complementaria en la región del ADN que se pretende analizar y la tercera fase es la de elongación de la cadena de ADN a partir de esos *primers* o cebadores. Esta última etapa (elongación) se realiza mediante el enzima Taq Polimerasa. El resultado es una acumulación exponencial de la secuencia específica de ADN que se pretende estudiar.

Una vez purificado, este producto de la PCR se secuencia. En el diseño de los *primers* para realizar la PCR se han incluido los adaptadores necesarios para realizar la secuenciación.

El proceso de secuenciación consta de varias fases. Una vez obtenida la librería, el producto de la PCR con los adaptadores, se entra en la fase de emulsión, con la desnaturalización de la doble cadena de ADN y la unión de una cadena de ADN a una esfera. A cada esfera se le une una única cadena de ADN y sobre esta esfera se vuelve a hacer una amplificación clonal.

El siguiente paso es colocar cada una de estas esferas en una placa receptora con los reactivos necesarios para la secuenciación, *primer*, nucleótidos y la enzima ADN polimerasa. Esta placa se introduce en el secuenciador, el *primer* y la ADN polimerasa se unen a los fragmentos de ADN de la esfera y se van añadiendo los nucleótidos. Cada nucleótido que se añade emite luz y ésta es recogida por una cámara que va generando imágenes que luego son decodificadas por un software.

Del primer grupo de datos se obtuvieron, a nivel taxonómico, 244.849 asignaciones, que se distribuyeron en 319 géneros y 847 especies diferentes. Se utilizó un método de triple

filtrado en el que debía existir una coincidencia de identidad con la base de datos superior al 90%, una abundancia superior a 10 hits y una presencia en al menos 3 pacientes. Un hit es una secuencia que coincide con una determinada secuencia de referencia. En este caso, la presencia de las bacterias descritas estaba respaldada por más de 10 secuencias parejas.

Para estimar la diversidad bacteriana se determinó el número de operational taxonomic units (OTUs) de la muestra y se realizó el análisis de rarefacción (figura 25a). Las curvas de rarefacción se obtuvieron trazando el número de OTUs observados en función del número de secuencias usando la plataforma MG-RAST (177) y la base de datos RDP (178,179).

Para estimar la diversidad total, se agruparon las secuencias en un umbral estándar del 98% de identidad nucleótida sobre una longitud de alineación de secuencia del 90% para permitir una mínima flexibilidad y minimizar los falsos positivos. Las curvas de rarefacción se obtuvieron usando los conductos de pirosecuenciación RDP. Se desarrolló un diagrama de Venn (figura 25b) y un análisis del componente principal (PCA) y se generaron heatmaps (mapas de calor) (figura 26) usando paquetes estadísticos (180). El análisis de Venn se compone de datos de diversidad taxonómica. El análisis PCA se compone de la diversidad taxonómica y la abundancia de cada muestra individual y de la media de cada grupo.

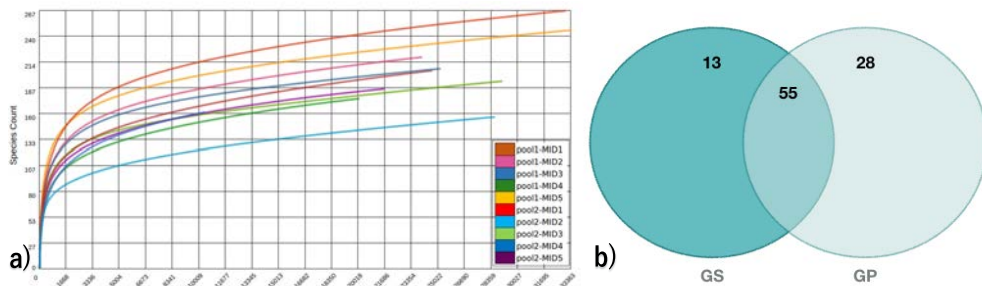


Figura 25. a) Curva de rarefacción y b) diagrama de Venn. Pool 1 (pacientes de GP, 1 a 5), Pool 2 (pacientes de GS, 1 a 5).

La microbiota se comparó mediante análisis estadístico usando matrices de distancia métrica (181). Este análisis compara la diversidad estimada del 16S a través de un planteamiento filogenético que tiene en cuenta tanto las lecturas taxonómicas asignadas como las no asignadas. Se realizaron mapas de calor para el análisis de la diversidad taxonómica y de la abundancia para cada muestra.

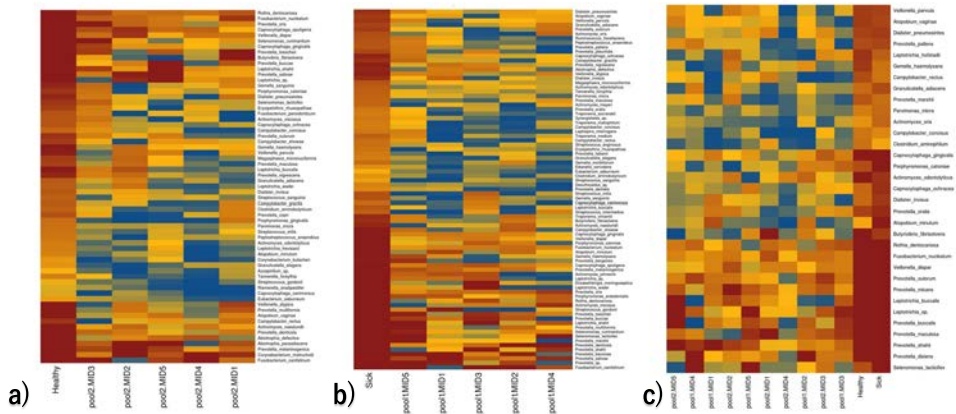


Figura 26. Heatmap, a) GS, b) GP y c) GS + GP.

Resultados

Después de extraer los datos metagenómicos, la calidad de las lecturas se evaluó mediante una herramienta de control de calidad. Las muestras fueron de excelente calidad (valores Phred > 28). Las lecturas desconocidas (no identificadas como genes ARNr) variaron entre las muestras (desde el 0,08% al 0.31%). Las muestras utilizadas en este estudio fueron depositadas en el GenBank con número de acceso SAMN06116059 a SAMN06116068.

El número de lecturas (filtradas y asignadas) y el número de asignaciones taxonómicas (géneros y especies) se describen en la tabla 5. Aunque las curvas de rarefacción de la microbiota no alcanzaron la fase de saturación, la pendiente de la curva se volvió notablemente menos pronunciada.

Muestras	A	B	C	D	E	F	G
GP	127.283	124.462	124.068	420	72	1.059	227
GP_MID1	24.635	24.250	24.156	79	48	207	147
GP_MID2	24.019	23.663	23.602	90	54	221	159
GP_MID3	25.170	24.610	24.529	89	57	208	149
GP_MID4	20.068	19.557	19.502	68	49	178	134
GP_MID5	33.391	32.382	32.279	98	62	249	166
GS	122.616	120.930	120.781	406	82	972	220
GS_MID1	33.010	32.723	32.686	27	60	269	170

Muestras	A	B	C	D	E	F	G
GS_MID2	28.569	28.308	28.276	21	44	159	107
GS_MID3	29.038	28.745	28.703	21	60	196	141
GS_MID4	10.378	9.980	9.972	75	51	164	115
GS_MID5	21.621	21.174	21.144	85	58	188	131

Tabla 5: A) Lecturas, B) Lecturas filtradas, C) Asignaciones taxonómicas, D) Asignaciones de género, E) Número de asignaciones de género identificadas sobre 90 y abundancia superior a 10, F) Número de asignaciones de especie y G) Número de asignaciones de especie sobre 90 y abundancia superior a 10

Los resultados taxonómicos mostraron 96 especies diferentes (figura 25b): 55 comunes a ambos grupos, 28 únicamente encontradas en GP y 13 específicas de GS. Ambos grupos mostraron una distribución homogénea (mas clara en GS). El mapa de calor muestra claramente un número de especies con una mayor representación sobre el total de las bacterias, sobrerrepresentadas particularmente en GS. Las especies de bacterias más abundantes (>5% del total) se muestran en la tabla 6,y y 8 y fueron: 1) GP *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella oris*, *Prevotella denticola* y *Prevotella melaninogenica*; 2) GS: *F. Nucleatum*, *P. melaninogenica*, *Rothia dentocariosa*, *P. oris* y *Veillonella párvula*; y 3) en general: *F. nucleatum* sobrerrepresentada en GS. El género *Prevotella* fue al más común en el total y *P. denticola* estaba sobrerrepresentada en GP con una abundancia 13 veces mayor que en GS.

Especie		Cantidad en GP	Cantidad en GS	Sobrerrepresentada significativamente en
G+	<i>Abiotrophia defectiva</i>	1788	2112*	
G+	<i>Actinomyces naeslundii</i>	1943	2526*	
G+	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	582*	477	
G+	<i>Actinomyces viscosus</i>	1734*	440	GP
G+	<i>Atopobium minutum</i>	735*	172	GP
G+	<i>Atopobium vaginae</i>	720	947*	
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	703	1815*	GS
G-	<i>Campylobacter concisus</i>	245	512*	GS
G-	<i>Campylobacter gracilis</i>	847	1007*	
G-	<i>Campylobacter rectus</i>	670*	531	
G-	<i>Campylobacter showae</i>	1578*	631	GP

	Especie	Cantidad en GP	Cantidad en GS	Sobrerrepresentada significativamente en
G-	<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	322*	42	GP
G-	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	4458*	2995	
G-	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	1716*	542	GP
G-	<i>Capnocytophaga sputigena</i>	5591	6440*	
G+	<i>Clostridium aminobutyricum</i>	70	131*	GS
G-	<i>Dialister invisus</i>	991*	815	
G-	<i>Dialister pneumosintes</i>	1300	1398*	
	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	113	198*	GS
	<i>Eubacterium saburreum</i>	412*	325	
G-	<i>Fusobacterium canifelinum</i>	2146	2895*	
G-	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	15404	24714*	GS
G+	<i>Gemella haemolysans</i>	546	657*	
G+	<i>Gemella morbillorum</i>	803*	76	GP
G+	<i>Gemella sanguinis</i>	229	394*	GS
G+	<i>Granulicatella adiacens</i>	610	792*	
G+	<i>Granulicatella elegans</i>	141	158*	
G-	<i>Leptotrichia buccalis</i>	921	922*	
G-	<i>Leptotrichia shahii</i>	1637*	1110	
G-	<i>Leptotrichia sp. HKU24</i>	457	805*	GS
G-	<i>Leptotrichia wadei</i>	1688*	830	GP
G-	<i>Megasphaera micronuciformis</i>	983*	780	
G+	<i>Parvimonas micra</i>	1114*	1085	
G+	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	230*	142	GP
G-	<i>Porphyromonas catoniae</i>	2276*	1195	GP
G-	<i>Prevotella buccae</i>	2670	3566*	
G-	<i>Prevotella denticola</i>	11352*	862	GP
G-	<i>Prevotella loescheii</i>	3338*	3005	
G-	<i>Prevotella maculosa</i>	454*	413	
G-	<i>Prevotella melaninogenica</i>	8895	10583*	
G-	<i>Prevotella multiformis</i>	801*	300	GP

	Especie	Cantidad en GP	Cantidad en GS	Sobrerrepresentada significativamente en
G-	<i>Prevotella nigrescens</i>	3297*	2234	
G-	<i>Prevotella oris</i>	12264*	8222	
G-	<i>Prevotella oulorum</i>	1348*	1068	
G-	<i>Prevotella salivae</i>	4397*	3257	
G+	<i>Rothia dentocariosa</i>	4491	8684*	GS
	<i>Selenomonas lactificex</i>	999*	214	GP
	<i>Selenomonas ruminantium</i>	4390*	2250	GP
G+	<i>Streptococcus gordonii</i>	953*	94	GP
G+	<i>Streptococcus mitis</i>	816*	519	GP
G+	<i>Streptococcus sanguinis</i>	427	834*	GS
G-	<i>Tannerella forsythia</i>	577*	376	GP
G-	<i>Veillonella atypica</i>	1157*	876	
G-	<i>Veillonella dispar</i>	3535	6110*	GS
G-	<i>Veillonella parvula</i>	4118	7698*	GS

Tabla 6. Especies bacterianas encontradas en ambos grupos.

Especies específicas de GS		
G+	<i>Abiotrophia para-adiacens</i>	1353
	<i>Azospirillum sp. BV-s</i>	46
	<i>butyrate-producing bacterium SM4/1</i>	419
	<i>butyrate-producing bacterium SS3/4</i>	87
G+	<i>Corynebacterium kutscheri</i>	58
G+	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	4629
G-	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	514
G-	<i>Leptotrichia trevisanii</i>	162
G-	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	611
G-	<i>Prevotella copri</i>	290
G-	<i>Riemerella anatipestifer</i>	52
	<i>uncultured Kingella sp.</i>	1048
	<i>uncultured Streptococcus sp.</i>	1069

Tabla 7: Especies bacterianas encontradas únicamente en individuos sin antecedentes de periodontitis (GS).

Especies específicas de GP		
G+	<i>Actinomyces johnsonii</i>	538
G+	<i>Actinomyces meyeri</i>	234
G+	<i>Actinomyces oris</i>	652
	<i>Desulfocaldus sp. Hobo</i>	78
G-	<i>Eikenella corrodens</i>	299
G-	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	664
G-	<i>Leptospira interrogans</i>	189
G-	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	7183
G-	<i>Prevotella baroniae</i>	4502
G-	<i>Prevotella bergensis</i>	307
G-	<i>Prevotella dentalis</i>	127
G-	<i>Prevotella falsenii</i>	180
G-	<i>Prevotella marshii</i>	1585
G-	<i>Prevotella nanceiensis</i>	35
G-	<i>Prevotella oralis</i>	398
G-	<i>Prevotella pallens</i>	1077
G-	<i>Prevotella pleuritidis</i>	208
G-	<i>Prevotella shahii</i>	1046
G-	<i>Prevotella sp. 8400706</i>	2267
G+	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	184
G+	<i>Streptococcus anginosus</i>	323
G+	<i>Streptococcus intermedius</i>	508
G-	<i>Synergistetes bacterium SGP1</i>	103
G+	<i>Treponema maltophilum</i>	443
G+	<i>Treponema medium</i>	599
G+	<i>Treponema socranskii</i>	1089
G+	<i>Treponema vincentii</i>	1021
	<i>uncultured Porphyromonas sp.</i>	3949

Tabla 8: Especies bacterianas encontradas únicamente en individuos con antecedentes de periodontitis (GP).

Especies	Papel en humanos	Referencia	Presencia en la muesyta (post-filtrado en abundancia)											
			GP					GS						
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
<i>Abiotrophia para-adiacens</i>	Endocarditis	Kanamoto et al. J Clin Microbiol. 2000; 38: 492-8.	N P	+	N P	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Azospirillum</i> sp.	Encontrada en cereales	Bao et al. Microbes Environ. 2013;28:487-90.	N P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	Típica microbiota oral de perros y gatos. ISe ha identificado como un patógeno en humanos	Escande et al. Eur J Epidemiol. 1996;12:521-33.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Infecciones oportunistas. Presente en animales de compañía (roedores)	Holmes et al. J Clin Microbiology. 2007;45:3468-9.	N P	N P	N P	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Desulfocaldus</i> sp. Hobo	Presente en agua e insectos	Baena et al. Int J Syst Evol Microbiol. 2011;61:732-6.	+	+	+	+	N P	N P	N P	N P	+	+	+	+
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	Bacteria acuática común presente en ambibios y peces. Meningitis en neonatos. Infección en pacientes con ventilación asistida. Infecciones nosocomiales	Weaver et al. Infect Control Hosp Epidemiol. 2010;31:54-8.	+	+	+	N P	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Patógeno animal y humano (zoonotic). Transmisión entre animals vivos y/o por sus productos (mataderos y charcuterías)	Gorby et al. Rev Infect Dis. 1988;10:317-25.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Eubacterium saburreum</i>	Microbiota oral	Sato et al. Carbohydr Res. 2003;22:338:923-30.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fusobacterium canifelinum	Microbiota oral típica en gatos y patógeno en humanos	Conrads et al. Syst Appl Microbiol. 2004;27:407-13.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leptospira interrogans	Patógeno humano típico en individuos que viven en áreas con poca higiene, roedores o agua contaminada	Zhijun et al. Microb Cell Fact. 2007; 6: 39.	+	+	+	+	NP	+	NP	+	+	+	+
Leptotrichia sp. HKU24	Reservorio en la cavidad oral	Woo et al. Univ Sci B. 2010;11:391-401.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prevotella bergensis	Microbiota oral. Patógenos humano de tejidos blandos	Downes et al. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:609-12.	+	+	+	+	+	+	NP	+	+	+	+
Prevotella copri	Microbiota oral. Aislado de heces humanas	Hayashi et al. Int J Syst Evol Microbiol. 2007;57:941-6.	NP	NP	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prevotella sp. 8400706	Patógeno en humanos. Abscesos	Downes et al. Int J Syst Evo Microbiol. 2008; 58:1788–91.	+	+	+	+	+	+	NP	+	+	+	+
Riemerella anatipestifer	Patógeno en pájaros (patos), no afecta a los humanos	Leavitt et al. Can Vet J. 1997; 38: 113.	+	+	NP	+	+	+	+	+	NP	NP	NP
Ruminococcus flavefaciens	Especie gastrointestinal en humanos	Mirjana et al. FEMS Microbiol Rev. 2014; 38: 996–1047.	+	+	+	+	NP	+	+	+	+	+	+
Selenomonas lacticifex	Bacteria intestinal animal	Yang et al. Mol Biol Rep. 2010;37:2063-73.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Selenomonas ruminantium	Microbiota oral alterada (placa y abscesos)	Salako et al. Arch Oral Biol. 1989;34:787-91.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Synergistetes bacterium SGP1	Aislada de bolsas periodontales profundas	Vartoukian et al. Int J Syst Evol Microbiol 63:458-463	+	+	+	+	+	+	NP	+	+	+	+

NP: Bacteria ausente en la muestra estudiada

Tabla 9. Especies encontradas no identificadas por el Human Oral Microbiome Database.

Microbiota Analysis of Biofilms on Experimental Abutments Mimicking Dental Implants: An In Vivo Model

Berta Cortés-Acha,* Rui Figueiredo,*† Ramón Seminago,† Francisco J. Roig,§ Carlos Llorens,†§ and Eduard Valmaseda-Castellón*†

Background: The microbiota colonizing dental implants has been said to be similar to the microbiome surrounding teeth. In the absence of inflammation, a biofilm with pathologic bacteria can cover implant surfaces exposed to the oral cavity, for example, due to a remodeling process. The aim of the present study is to identify microbiota surrounding exposed dental implants in patients with and without a history of periodontitis through a deep-sequencing approach.

Methods: An experimental abutment with the same surface and structure as a commercially available dental implant was used. Bacterial DNA was isolated, and the 16S ribosomal RNA gene was amplified and sequenced. Multiplexed tag-encoded sequencing of DNA from the samples was performed, and the reads were processed by metagenomic rapid annotation.

Results: A wide variety of bacteria, 96 species, were identified. The most frequently found bacteria were *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella denticola*. Some species generally associated with periodontitis were found to a greater extent in patients without a history of periodontitis. Some bacteria that have never been described as part of the oral microbiome were identified in the present sample.

Conclusions: Analysis of data suggests that the bacteria surrounding exposed dental implants form a diverse microbiome regardless of the periodontal profile of patients. Further research is needed to clarify the role of these microorganisms in the oral environment. *J Periodontol* 2017;88:1090-1104.

KEY WORDS

Bacteria; biofilms; dental abutments; dental implants; microbiology; microbiota.

* Oral Surgery and Implantology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

† Bellvitge Biomedical Research Institute, Barcelona, Spain.

‡ Unit of Genomics, Scientific and Technological Centers, University of Barcelona.

§ Biotechvana, Valencia, Spain.

O sseointegrated dental implants have become an important alternative for replacing missing teeth. Despite high survival and success rates of dental implants, biologic complications, mainly peri-implant mucositis and peri-implantitis, are a growing concern. It is estimated that 12% to 22% of patients with implants will be diagnosed with peri-implantitis within a short-term follow-up (5 years).¹

Peri-implantitis is considered an infectious chronic disease that starts with the formation of a heterogeneous biofilm community.² Recent findings suggest a model of pathogenesis in which periodontitis is initiated by a broadly based, dysbiotic, synergistic microbiota,³ as opposed to the traditional view of a conventional infectious disease caused by one or more periopathogens such as the “red complex.”⁴ This could also be the case with peri-implant diseases.⁵ The microbiota colonizing implants is still poorly known, and its differences from biofilms around teeth need further investigation. In fact, due to the macrostructure and surface characteristics of implants, biofilm content can be quite different and can favor the presence of pathologic bacteria even in absence of peri-implant diseases. To the authors’ knowledge, no data have been published on microbiota formed in patients whose implants have become exposed to the oral cavity due to soft tissue recession but who have no inflammation.

doi: 10.1902/jop.2017.170051

This knowledge is essential to prevent initiation and progression of peri-implant diseases.

A number of methods have been used to study the microbiota surrounding dental implants.⁶⁻⁸ Samples have been collected by rubbing or scratching implants with sterile paper points, curets, or periodontal probes. These procedures recover some of the bacteria but may fail to identify microorganisms that remain firmly attached to the implant surface. Recovering the entire biofilm on exposed implants would be of great value, but this is only possible when the implant is retrieved (i.e., in advanced cases that can only be treated by explantation). A removable abutment mimicking the macrostructure and microstructure of an implant would make it possible to recover an intact biofilm similar to that covering an exposed implant.

Another very important limitation of most studies on this issue is that their techniques, such as oligonucleotide probes, polymerase chain reaction (PCR), and checkerboard DNA-DNA hybridization, do not allow massive bacterial sequencing.^{6,9-11} Pyrosequencing provides a more complete view of the oral microbiome. Using metagenomic techniques and next-generation sequencing technology, the total DNA pool in complex microbiologic samples can be analyzed. This method can detect most species and identify bacteria that cannot be cultivated by standard techniques.

The hypothesis that microbiota colonizing the surface of experimental abutments mimicking exposed dental implants without peri-implant diseases contain a large number of bacterial species, with predominance of Gram-negative bacteria and with differences among patients with and without a previous history of periodontitis, is presented. Therefore, the present study identifies the microbiome formed on abutments that simulate exposed dental implants using pyrosequencing and compares the bacteria of healthy patients and patients with a history of periodontitis.

MATERIALS AND METHODS

Patient Recruitment

The experimental non-randomized study consisted of 10 individuals (six males and four females, aged 45 to 84 years; mean age: 60.7 years) with at least one healthy osseointegrated dental implant with a hexagonal external connection, of whom five had a history of periodontitis (periodontitis group, PG), and five were periodontally healthy (healthy group, HG).

Patients were defined as periodontally healthy when they had no attachment loss (AL), no bone loss (BL) measured in periapical radiographs, probing depth (PD) of <4 mm, and no bleeding on probing (BOP) for at least 70% of sites. They were considered to have history of periodontitis when they presented AL ≥1 mm at >30% of sites and evidence of BL. It should be pointed out that all patients in PG had been treated,

and the disease was under control when they were enrolled in the present trial. All patients met the following inclusion criteria: 1) aged 18 to 90 years; 2) American Society of Anesthesiologists (ASA) health status score¹² ≤3; 3) osseointegrated implants with hexagonal external connection; 4) not having received final prosthesis; 5) gingival height of 2 mm from implant shoulder to gingival margin; and 6) sufficient intellectual capacity to understand the study. Study protocol was approved by the Institutional Review Board (Clinical Research Ethics Committee; protocol number 05/14), Dental Hospital, University of Barcelona, Barcelona, Spain, and complied with the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2013. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Patients were excluded in the following situations: 1) generalized gingivitis with BOP at >30% of sites; 2) uncontrolled periodontal disease (PD ≥5 mm with bleeding and/or suppuration); 3) peri-implant disease (implants with bleeding and/or suppuration, and at least one site with radiographic evidence of BL ≥2 mm); 4) any periodontal treatment in the 30 days prior to enrollment; or 5) use of antibiotic or antiseptic mouthrinse (bisbiguanides, quaternary ammonium salts, and essential oils) in the 30 days prior to enrollment.

Data Sampling

A single researcher (BC-A) recruited the patients from February to September 2014 at the Dental Hospital of the University of Barcelona, Hospital de Llobregat (Barcelona, Spain) and examined all clinical records. Data retrieved were age, sex, patient health status based on the ASA Physical Status Classification System,¹² systemic pathologies, current medication, smoking habit (number of cigarettes per day), periodontal disease (periodontal chart with recessions, PD, BOP, and suppuration), and the following implant variables: 1) date of implant placement; 2) diameter; 3) length; 4) position; 5) distance from any nearby implants; 6) width of keratinized mucosa; 7) type of prosthesis; 8) Mombelli peri-implant plaque index (PPI);¹³ 9) Mombelli peri-implant sulcus bleeding index (PSBI);¹³ 10) suppuration; 11) peri-implant PD; and 12) BL. BL was measured on digital periapical radiographs using image processing software.¹⁴

Sample Collection and DNA Isolation

The abutments used, specifically fabricated for this purpose, were designed to have the same macroscopic and microscopic shape as an implant with a bioabsorbable blast media surface[¶] (see supplementary Fig. 1 in online *Journal of Periodontology*).

After a thorough explanation of the study objectives, a healing abutment was replaced by the experimental

¶ ImageJ software, US National Institutes of Health, Bethesda, MD.

¶ Mozo-Grau dental implants, Mozo-Grau, Valladolid, Spain.

abutment (see supplementary Fig. 1 in online *Journal of Periodontology*). Patients were instructed to refrain from cleaning the abutment and using toothpaste or mouthrinse solutions during the study period.

After 14 days, the experimental abutment was carefully removed, placed in a sterile snap-cap tube, and transported to the laboratory in <1 hour in a portable refrigerator at 4°C. The abutment was screwed to an implant analog placed inside the tube, allowing the biofilm to remain intact without touching the tube wall.

All patients were enrolled in a peri-implant maintenance program, and a final prosthesis was made.

After the abutment was received at the laboratory, it was unscrewed, stored in a 1.5-mL microcentrifuge tube, and frozen at -80°C until further analysis. The abutment was rinsed with phosphate-buffered saline and vortexed for 5 minutes to release the bacteria. Total DNA was purified with a DNA purification kit,[#] according to the manufacturer's protocol for buccal swabs. The amount of DNA extracted was calculated using a scientific instrumentation system.**

Statistical Analyses

Variable regions V1, V2, V3, V4, and V5 of the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene were amplified with a multiplex PCR system^{††} and sequenced with a titanium sequencing kit.^{‡‡}

PCRs for V1-V3 and V5-V3 primers were set up with annealing temperatures of 56°C and 50°C, respectively. Two replicate PCRs were performed and pooled for each sample. Amplicon library was cleaned with a PCR purification system,^{§§} according to the manufacturer's instructions. Amplicon concentration was estimated using an assay kit.^{|||}

Multiplexed tag-encoded sequencing of DNA from the samples was performed on a pyrosequencing platform.^{¶¶}

Primers used to amplify the 16S rRNA gene and to introduce multiplex identifiers to identify amplicons or samples are available on the National Institutes of Health Human Microbiome Project website.¹⁵

The resulting fast files were preprocessed with a quality control and data preprocessing tool¹⁶ by size (more than 50 bp), quality (minimum quality 30), and N content (rejecting reads with >5% of Ns and removing terminal Ns).

The reads were processed through metagenomic rapid annotation using subsystems technology (MG-RAST)¹⁷ based on hierarchical classification with the Ribosomal Database Project (RDP; release 11). MG-RAST default clustering parameters within the basic local alignment search tool-like alignment tool algorithm were used.

Each read was taxonomically assigned down to the genus and species level with 80% confidence

threshold. Reads giving no bacterial hits were excluded. Artificial replicate sequences produced by sequencing artifacts were removed.¹⁸

To estimate bacterial diversity, the number of operational taxonomic units (OTUs) in the samples was determined, and rarefaction analysis was performed. Rarefaction curves were obtained using the number of observed OTUs against the number of sequences, using the MG-RAST platform¹⁷ and the RDP database.^{19,20}

To estimate total diversity, sequences were clustered at a standard threshold of 98% nucleotide identity over a 90% sequence alignment length to allow minimal flexibility and to minimize false positives. Rarefaction curves were obtained using the RDP pyrosequencing pipeline (Fig. 1A). Venn analysis (Fig. 1B) and principal component analysis (PCA) were performed, and heatmaps were generated using a statistical package.²¹ Venn analysis was run on taxonomic diversity data. PCA analysis was run on taxonomic diversity and abundance of each individual sample and on the average of each group (i.e., PG and HG) (Fig. 1C).

Microbial communities were compared by statistical analysis using a distance metric matrix.²² This analysis compares the 16S estimated diversity through a phylogenetic approach that takes taxonomically assigned and unassigned reads into account (Fig. 2). Heatmap analysis of taxonomic diversity and abundance was done for each sample (Fig. 3).

RESULTS

After extracting metagenomic data, quality of the readings was assessed by a quality control tool.^{##} Sequencing samples were of excellent quality (Phred values >28). Unknown reads (not identified as rRNA genes) varied among samples, ranging from 0.08% to 0.31%. Samples used in this study were deposited in the GenBank under accession numbers SAMN06116059 to SAMN06116068.

Oral Microbial Community

The number of reads (filtered and assigned) and number of taxonomic assignments (genus and species) are listed in Table 1. Although microbiota-based rarefaction curves (Fig. 1A) failed to reach saturation phase, the slope of the curves become notably less pronounced.

QiAmp DNA minikit, Qiagen, Hilden, Germany.

** Qubit system, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA.

†† FastStart High Fidelity PCR Systems, Roche, Mannheim, Germany.

‡‡ GS Junior titanium sequencing kit, Roche.

§§ Agencourt AMPure beads, Beckman Coulter, Brea, CA.

||| Qubit dsDNA HS assay kit, Thermo Fisher Scientific.

¶¶ GS Junior platform, Roche Applied Science, Indianapolis, IN.

FastQC pipelines, Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, U.K.

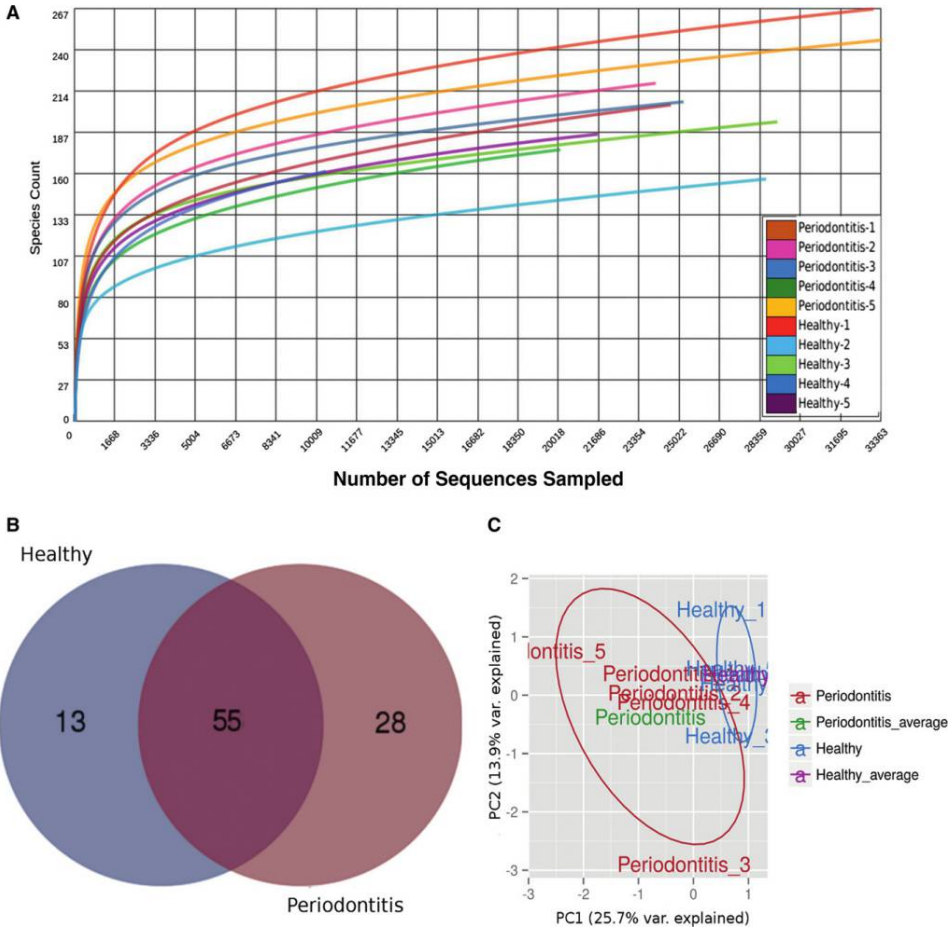


Figure 1. **A)** Rarefaction plot showing a curve of annotated species richness. This curve represents the total number of distinct species annotations as a function of the number of sequences sampled. **B)** Venn diagram demonstrating bacterial taxonomic distribution between diseased and healthy samples. **C)** PCA relationships among groups of samples. Circles include samples belonging to the same group.

Taxonomic results showed 96 different species: 55 common to both groups, 28 only found in PG, and 13 specific to HG (Figs. 1B and 4; Table 2). Both groups showed homogeneous distribution (clearer in HG). The heatmap (Fig. 3) clearly shows a number of species with greater representation in the overall number of bacteria, overexpressed particularly in HG.

The most abundant bacterial species among those >5% of the total were as follows: 1) PG: *Fusobacterium*

nucleatum, *Prevotella oris*, *Prevotella denticola*, and *Prevotella melaninogenica*; 2) HG: *F. nucleatum*, *P. melaninogenica*, *Rothia dentocariosa*, *P. oris*, and *Veillonella parvula*; and 3) overall: *F. nucleatum*, *P. oris*, *P. melaninogenica*, *R. dentocariosa*, and *P. denticola*. The most commonly found was *F. nucleatum*, over-represented in HG. The genus *Prevotella* was the most common overall, and *P. denticola* was overrepresented in PG, with 13 times higher abundance than in HG.

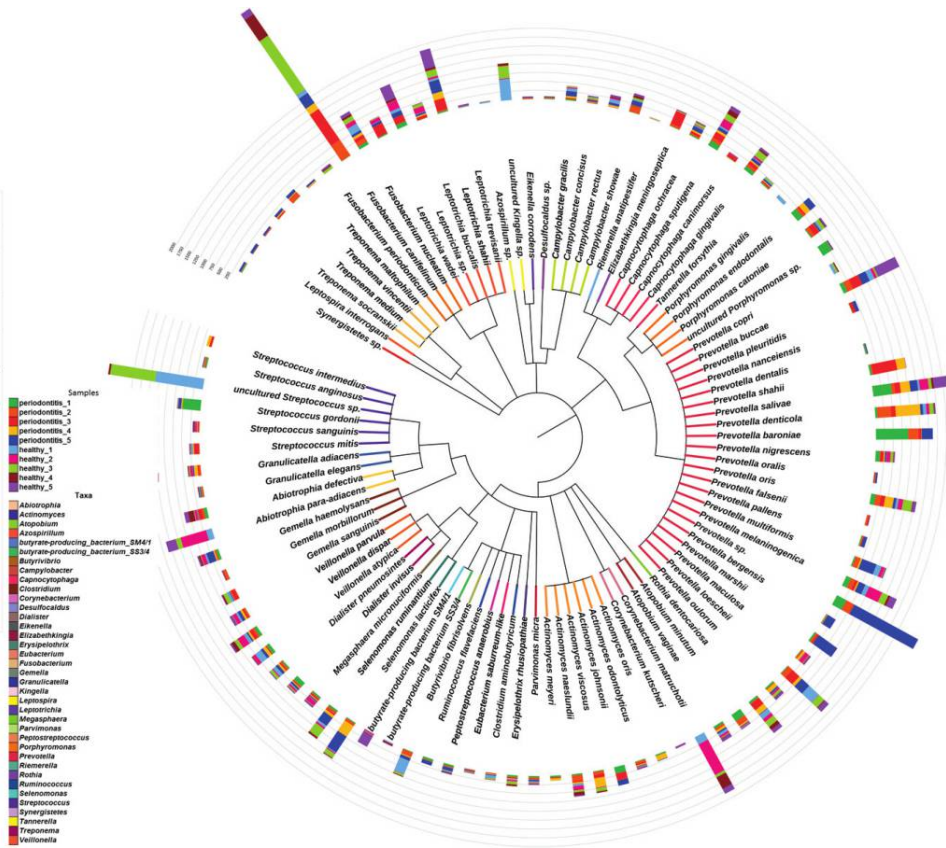


Figure 2. Bacteriome cladogram with pyrosequencing datasets of the two groups of samples (PG and HG: pool 1 and pool 2). The RDP database²⁰ was used as the annotation source, and a minimum identity cutoff of 98% was applied. Colors for the genus branches are indicated in the taxa section of the key. Bars in the external circle indicate abundance of the term in each sample. Colors of the samples are indicated in the samples section of the key.

Sixteen of the bacteria found have been related to microbial complexes of subgingival plaque⁴ (see supplementary Table 1 in online *Journal of Periodontology*).

Bacteria from the green and purple clusters seemed to be more numerous than others, except for the above-mentioned bacteria and *Campylobacter showae* (orange cluster).

Regarding differences between groups (Table 2), periodontopathogens were not more prevalent in PG than in HG. Moreover, *Porphyromonas gingivalis* was only found in healthy individuals. In contrast, first colonizers such as *Streptococcus anginosus* and *Streptococcus intermedius* were only found in PG.

Of the 96 bacteria identified, 19 were not in the Human Oral Microbiome Database (HOMD)²³ or the CORE Microbiome Database.²⁴

DISCUSSION

Implant surfaces are designed to enhance osseointegration. When bone remodeling or loss occurs and areas of the implant surface become exposed to the oral environment, saliva biopolymers form a film that becomes the interface between the implant surface and the first microorganisms. Many characteristics of the titanium implant surface, such as roughness, hydrophobicity, and charge, affect bacterial adhesion.²⁵

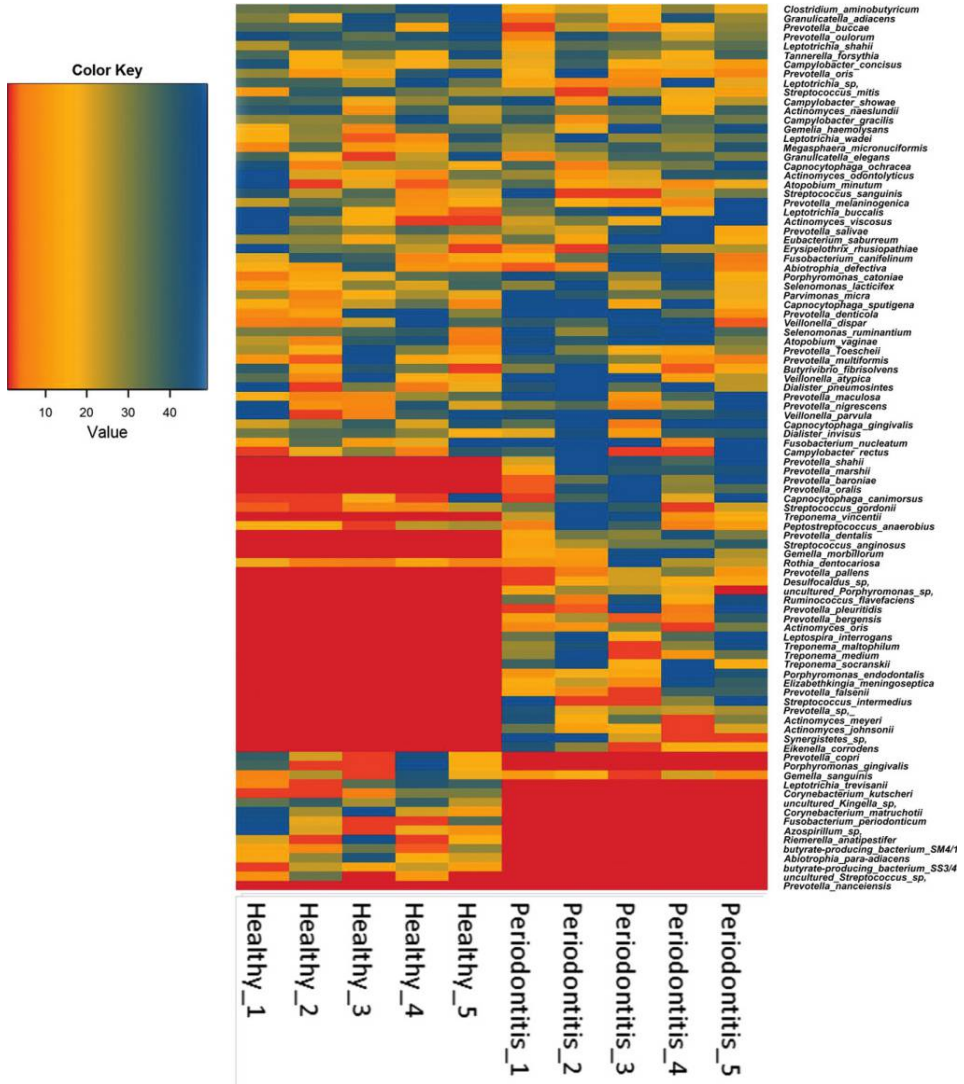


Figure 3. Heatmap visualization of changes in bacterial diversity among groups (HG and PG, represented by individual samples).

Table I.
Clinical Features of Enrolled Patients, Number of Reads, and Assigned Taxa by Sample

Group Code	Sex	Age (years)	ASA Status	Systemic Pathology	Cigarettes per Day	Implant Position	KT (mm)	PPI	PSBI	PD (mm)	No. of Reads	No. of Filtered Reads	No. of Taxonomic Assignations	No. of Assigned Genera Filtered*	No. of Assigned Genera	No. of Assigned Species	No. of Assigned Species Filtered*
HG-1	Male	84	II	Hypertension; arthrosis	0	12	3	1	1	3	33,010	32,723	32,686	27	60	269	170
HG-2	Female	45	I	None	15	30	3	0	0	2	28,569	28,308	28,276	21	44	159	107
HG-3	Male	71	II	Ulcerative colitis	0	4	7	0	0	2	29,038	28,745	28,703	21	60	196	141
HG-4	Female	53	I	None	0	19	6	0	0	2	10,378	9,980	9,972	75	51	164	115
HG-5	Female	60	II	Anemia	0	30	5	0	0	2	21,621	21,174	21,144	85	58	188	131
PG-1	Male	51	II	Hypertension	0	18	3	1	0	2	24,635	24,250	24,156	79	48	207	147
PG-2	Male	61	II	High cholesterol; hypertension	0	30	3	0	0	3	24,019	23,663	23,602	90	54	221	159
PG-3	Male	74	II	Type 2 diabetes mellitus; high cholesterol	0	21	4	1	0	2	25,170	24,610	24,529	89	57	208	149
PG-4	Male	55	I	None	0	18	1	0	1	2	20,068	19,557	19,502	68	49	178	134
PG-5	Female	53	II	Arthritis	0	29	5	1	1	3	33,391	32,382	32,279	98	62	249	166

KT = keratinized tissue.
*Identity over 90 and abundance over 10.

Table 2.
Abundance and Overrepresentation of the Identified Species

Species	PG		HG		% Total	Overrepresented	Gram-Negative/Positive	Cluster
	Abundance	%	Abundance	%				
Common to PG and HG								
<i>Abiotrophia defectiva</i>	1,788	1.15	2,112	1.60	1.35		+	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	1,943	1.25	2,526	1.91	1.55		+	Blue
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	582	0.37	477	0.36	0.37		+	Blue
<i>Actinomyces viscosus</i>	1,734	1.11	440	0.33	0.76	Periodontitis	+	Blue
<i>Atopobium minutum</i>	735	0.47	172	0.13	0.32	Periodontitis	+	
<i>Atopobium vaginae</i>	720	0.46	947	0.72	0.58		+	
<i>Burkholderia fibrisolvens</i>	703	0.45	1,815	1.37	0.87		-	Orange
<i>Campylobacter concisus</i>	245	0.16	512	0.39	0.26	Healthy	-	Orange
<i>Campylobacter gracilis</i>	847	0.54	1,007	0.76	0.64	Healthy	-	Orange
<i>Campylobacter rectus</i>	670	0.43	531	0.40	0.42		-	Orange
<i>Campylobacter showae</i>	1,578	1.01	631	0.48	0.77	Periodontitis	-	
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	322	0.21	42	0.03	0.13	Periodontitis	-	Green
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	4,458	2.86	2,995	2.27	2.59	Periodontitis	-	Green
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	1,716	1.10	542	0.41	0.78	Periodontitis	-	Green
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	5,591	3.59	6,440	4.87	4.18		-	Green
<i>Clostridium aminobutyricum</i>	70	0.04	131	0.10	0.07	Healthy	+	
<i>Dialister inuisus</i>	991	0.64	815	0.62	0.63		-	
<i>Dialister pneumosintes</i>	1,300	0.83	1,398	1.06	0.94		-	
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	113	0.07	198	0.15	0.11	Healthy	-	
<i>Eubacterium saburreum</i>	412	0.26	325	0.25	0.26		-	
<i>Fusobacterium canifilium</i>	2,146	1.38	2,895	2.19	1.75		-	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	15,404	9.89	24,714	18.71	13.94	Healthy	-	
<i>Gemella haemolyans</i>	546	0.35	657	0.50	0.42		+	
<i>Gemella morbillorum</i>	803	0.52	76	0.06	0.31	Periodontitis	+	
<i>Gemella sanguinis</i>	229	0.15	394	0.30	0.22	Healthy	+	
<i>Granulicatella adiacens</i>	610	0.39	792	0.60	0.49		+	
<i>Granulicatella elegans</i>	141	0.09	158	0.12	0.10		+	
<i>Leptotrichia buccalis</i>	921	0.59	922	0.70	0.64		+	
<i>Leptotrichia shahii</i>	1,637	1.05	1,110	0.84	0.95		-	
<i>Leptotrichia sp. HKU24</i>	457	0.29	805	0.61	0.44	Healthy	-	
<i>Leptotrichia wadei</i>	1,688	1.08	830	0.63	0.87	Periodontitis	-	
<i>Megosphera micromorfiformis</i>	983	0.63	780	0.59	0.61		-	
<i>Parvimonas microa</i>	1,114	0.72	1,085	0.82	0.76		+	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	230	0.15	142	0.11	0.13	Periodontitis	+	
<i>Porphyromonas catoniae</i>	2,276	1.46	1,195	0.90	1.21	Periodontitis	-	
<i>Prevotella buccae</i>	2,670	1.71	3,566	2.70	2.17		-	

**Table 2. (continued)
Abundance and Overrepresentation of the Identified Species**

Species	PG		HG		% Total	Overrepresented	Gram-Negative/Positive	Cluster
	Abundance	%	Abundance	%				
<i>Prevotella denticola</i>	11,352	7.29	862	0.65	4.24	Periodontitis	-	
<i>Prevotella iosecheii</i>	3,338	2.14	3,005	2.27	2.20		-	
<i>Prevotella maculosa</i>	454	0.29	413	0.31	0.30		-	
<i>Prevotella melaninogenica</i>	8,895	5.71	10,583	8.01	6.77		-	
<i>Prevotella multififormis</i>	801	0.51	300	0.23	0.38	Periodontitis	-	Orange
<i>Prevotella nigrescens</i>	3,297	2.12	2,234	1.69	1.92		-	
<i>Prevotella oris</i>	12,264	7.87	8,222	6.22	7.12		-	
<i>Prevotella oulorum</i>	1,348	0.87	1,068	0.81	0.84		-	
<i>Prevotella salivae</i>	4,397	2.82	3,257	2.47	2.66		-	
<i>Rothia dentocarosa</i>	4,491	2.88	8,684	6.57	4.58	Healthy	+	
<i>Selenomonas lactifex</i>	999	0.64	214	0.16	0.42	Periodontitis	-	
<i>Selenomonas ruminantium</i>	4,390	2.82	2,250	1.70	2.31	Periodontitis	-	
<i>Streptococcus gordanii</i>	953	0.61	94	0.07	0.36		-	
<i>Streptococcus mitis</i>	816	0.52	519	0.39	0.46	Periodontitis	+	Yellow
<i>Streptococcus sanguinis</i>	427	0.27	834	0.63	0.44	Periodontitis	+	Yellow
<i>Tannerella forsythia</i>	577	0.37	376	0.28	0.33	Healthy	+	Yellow
<i>Veillonella atypica</i>	1,157	0.74	876	0.66	0.71	Periodontitis	-	Red
<i>Veillonella dispar</i>	3,535	2.27	6,110	4.62	3.35	Healthy	-	
<i>Veillonella parvula</i>	4,118	2.64	7,698	5.83	4.10	Healthy	-	Purple
PG only								
<i>Actinomyces johnsonii</i>	538	0.35			0.19			
<i>Actinomyces meyeri</i>	234	0.15			0.08			
<i>Actinomyces oris</i>	652	0.42			0.23			
<i>Desulfococcus</i> sp. Hobo	78	0.05			0.03			
<i>Eikenella corrodens</i>	299	0.19			0.10			
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	664	0.43			0.23			
<i>Leptospira interrogans</i>	189	0.12			0.07			
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	7,183	4.61			2.50			
<i>Prevotella baroniae</i>	4,502	2.89			1.56			
<i>Prevotella bergensis</i>	307	0.20			0.11			
<i>Prevotella dentalis</i>	127	0.08			0.04			
<i>Prevotella falsenii</i>	180	0.12			0.06			
<i>Prevotella marshii</i>	1,585	1.02			0.55			
<i>Prevotella nanceiensis</i>	35	0.02			0.01			
<i>Prevotella oralis</i>	398	0.26			0.14			
<i>Prevotella pallens</i>	1,077	0.69			0.37			
<i>Prevotella pleuritidis</i>	208	0.13			0.07			

Table 2. (continued)
Abundance and Overrepresentation of the Identified Species

Species	PG		HG		% Total	Overrepresented	Gram-Negative/Positive	Cluster
	Abundance	%	Abundance	%				
<i>Prevotella shahii</i>	1,046	0.67			0.36			
<i>Prevotella</i> sp.	2,267	1.46			0.79			
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	184	0.12			0.06			
<i>Streptococcus anginosus</i>	323	0.21			0.11			
<i>Streptococcus intermedius</i>	508	0.33			0.18			
<i>Synergistetes</i> sp.	103	0.07			0.04			
<i>Treponema matophilum</i>	443	0.28			0.15			
<i>Treponema medium</i>	599	0.38			0.21			
<i>Treponema sacranskii</i>	1,089	0.70			0.38			
<i>Treponema vincentii</i>	1,021	0.66			0.35			
Uncultured <i>Porphyromonas</i> sp.	3,949	2.54			1.37			
HG only								
<i>Abiotrophia paraadaciens</i>			1,353	1.02	0.47			
<i>Azospirillum</i> sp.			46	0.03	0.02			
butyrate-producing bacterium SM4/11			419	0.32	0.15			
butyrate-producing bacterium SS3/4			87	0.07	0.03			
<i>Corynebacterium kutscheri</i>			58	0.04	0.02			
<i>Corynebacterium matruchotii</i>			4,629	3.50	1.61			
<i>Fusobacterium periodonticum</i>			514	0.39	0.18			
<i>Leptotrichia trevisanii</i>			162	0.12	0.06			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>			611	0.46	0.21			
<i>Prevotella copri</i>			290	0.22	0.10			
<i>Riemerella anatipestifer</i>			52	0.04	0.02			
Uncultured <i>Kingella</i> sp.			1,048	0.79	0.36			
Uncultured <i>Streptococcus</i> sp.			1,069	0.81	0.37			

The present study adds new information regarding microbiota formed on implants when they become exposed to the oral cavity without associated inflammation (i.e., in soft tissue recession or bone remodeling processes). These data can also be useful when peri-implantitis patients are surgically treated with a resective approach. In these cases, after surface decontamination, an apically repositioned flap is made to reduce peri-implant pockets, thus exposing the rough surface of the implant.

One of the main limitations of this study is the reduced sample size, which may jeopardize generalization of outcomes. Also, the fact that all samples were collected after 14 days did not allow a study of the evolution of biofilm formation.

Periodontal disease is a known risk factor for peri-implantitis and one of the explanations, apart from patient susceptibility, is that periodontally involved teeth may act as a reservoir for periodontal pathogens that can colonize the implant surface.²⁶ However, a study using an open-ended molecular approach showed that in 85% of participants, <8% of species were shared between teeth and implants, suggesting that microbiology of peri-implantitis and periodontitis might be quite different.²⁷ Data from the present study, although obtained from healthy sites, seem to support these results, as species generally associated with diseased implants, such as *P. gingivalis*, are detected in healthy implants but only in periodontally healthy individuals. *P. gingivalis* might have an important role in peri-implant diseases as it has been described as an “enhancer species” that is involved in coaggregation stages during biofilm maturation.²⁸

On the other hand, many identified bacteria such as *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Campylobacter rectus*, *Parvimonas micra*, and *Granulicatella adiacens* or the genera *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Atopobium*, *Gemella*, *Rothia*, and *Leptotrichia* have been associated with healthy implants in previous studies.^{8,28-30} Special consideration should be taken with the genera *Actinomyces* and *Veillonella* as most authors^{28,31} agreed to finding them more frequently in healthy implants, and none of the revised studies associate them with peri-implantitis.^{8,28-33} Presence of these bacteria, together with *Streptococcus mitis* and *S. sanguinis*, may play a protective role regarding peri-implant diseases.^{34,35}

Prevotella spp. were found widely in both PG and HG, and *P. denticola* was one of the most abundant bacteria. It has been associated with periodontal disease as strongly as the classic red complex,³⁶ but it should be remembered that patients in PG had PD <4 mm and at least 70% of sites with no BOP. Therefore, presence of this genus in both groups may suggest that it is only pathogenic when the bacterial

balance is disturbed or when there is host susceptibility.

Another most abundant bacterium was *F. nucleatum*. It is known to mediate between the first and subsequent colonizers and interact with host cells, facilitating coaggregation with periodontopathogens such as *P. gingivalis*.³⁷ Some authors suggest that *F. nucleatum* infection facilitates attachment of *P. gingivalis* to the gingival fibroblast, and consequently these two bacteria are often found together.³⁸ Interestingly, *F. nucleatum* was abundant in both groups (15,404 in PG and 24,714 in HG), whereas *P. gingivalis* was not identified in PG but had an abundance of 611 in HG.

Previous publications concluded that in periodontally healthy individuals, *P. gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* were never³⁹ or rarely⁴⁰ found on implants. The present study contradicts this statement, as *P. gingivalis* was specifically found in HG. This disparity might be explained by the different analytic method (pyrosequencing), which in the authors' opinion affords more complete and detailed data gathering and should be implemented more frequently in the future.

The microbiome surrounding teeth has been shown to be significantly more diverse than that around implants.^{41,42} In addition, the rate of traditional pathogens around implants has been reported to be lower than that around teeth in both healthy and diseased patients.⁴³ Cortelli et al.⁴³ also pointed out that early colonizers of rough implant surfaces might constitute a different bacterial microbiome from that of periodontal diseases. The present report shows that individuals have an important variability regarding the composition of biofilm. This indicates that studies with large samples are required. It would be interesting to analyze whether this variability is related with the different progression patterns of BL found in peri-implantitis.

Streptococcus, *Granulicatella*, and *Gemella* were present in both PG and HG, in agreement with a previous study.⁴⁴ These bacteria are considered symbionts, with a high proportion returning to pockets after periodontal treatments.⁴⁵

Regarding differences among groups, special mention should be made of four bacteria with >1% abundance: *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella baroniae* and an uncultured *Porphyromonas* sp. in PG and *Corynebacterium matruchotii* in HG. *P. endodontalis* is found in symptomatic oral infections, such as endodontic infections and periodontal pockets, but also in asymptomatic cases. It shows low virulence in experimental mono-infections but seems to play an important role in anaerobic mixed infections.⁴⁶ *P. baroniae* has been described as a causal agent of endodontic abscesses.⁴⁷ *C. matruchotii* is considered part of normal oral microbiota.⁴⁸

High prevalence of Gram-negative bacteria in HG and Gram-positive bacteria in PG is surprising, as earlier studies demonstrated Gram-negative prevalence in oral microbiota.²

Although 19 bacteria were not registered in the HOMD or CORE databases, five had been reported previously, including *Prevotella bergensis*, *Leptotrichia* sp. *HKU24*, and *Prevotella copri*. The remaining 14 have been identified in human infections in other areas of the body or found in insects, contaminated water, dogs, cats, or birds (see supplementary Table 1 in online *Journal of Periodontology*). Contamination of samples during transport was highly unlikely because the snap-tubes were sterile, and the abutment did not touch its walls (it was firmly screwed to a sterile implant replica). Future research should examine whether these microorganisms play an important role in peri-implant diseases. This is quite an important finding, and once again indicates the importance of using metagenomic analysis techniques. Other microbiologic methods such as checkerboard DNA–DNA hybridization are indeed extremely accurate and have high sensitivity (>92.5%) and specificity (100%), but are clearly insufficient to detect composition of the microbiome surrounding implants.⁴⁹ Likewise, the sample collection method might cause important discrepancies among studies. Biofilms collected with curets can result in lower bacterial counts due to implant topography,¹¹ and sterile paper points can be a source of foreign bacteria.⁵⁰ This is an important advantage of the present method to recover biofilm. Other authors have previously reported use of abutments with different roughnesses⁵¹ for this purpose, but with no threads. Thus, a study comparing different biofilm sampling methods would be of interest.

CONCLUSIONS

A wide variety of bacteria (96 species) were found around abutments simulating exposed dental implants without inflammation in 10 individuals. The most frequently found bacteria were *F. nucleatum* and *P. denticola*. Some species generally associated with periodontitis were more commonly found in patients without history of periodontitis.

A large number of bacteria that had never been described as part of the oral microbiome were found in the present sample. Further research with larger samples is needed to clarify the role of these microorganisms in the oral environment.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Rubén León and Dr. Vanessa Blanc from the Research and Development and Microbiology Departments of Dentaid SL (Cerdanyola del Vallés, Spain) for critical review of the manuscript. The authors also thank Mary Georgina Hardinge (native British freelance translator, Valencia, Spain) for

English language editing of the manuscript. Dr. Figueiredo reports grants from the Faculty of Dentistry, University of Barcelona (Spain) and non-financial support from Mozo-Grau (Valladolid, Spain) during conduct of the study. Also, he reports grants, personal fees, and non-financial support from Mozo-Grau (Valladolid, Spain) and personal fees from BioHorizons Ibérica (Madrid, Spain), Inibsa Dental (Lliça de Vall, Spain), DENTSPLY implants Iberia (Barcelona, Spain), and ADIN implants (Afula, Israel) outside the submitted work. In addition, Dr. Figueiredo has a patent “Biofilm collector abutment” pending to Mozo-Grau, Rui Figueiredo, and Eduard Valmaseda-Castellón. Dr. Valmaseda-Castellón reports grants from the Faculty of Dentistry, University of Barcelona (Spain) and non-financial support from Mozo-Grau (Valladolid, Spain) during conduct of the study. Also, he reports grants, personal fees, and non-financial support from Mozo-Grau (Valladolid, Spain) and personal fees from BioHorizons Ibérica (Madrid, Spain), Inibsa Dental (Lliça de Vall, Spain), and DENTSPLY implants Iberia (Barcelona, Spain) outside the submitted work. In addition, Dr. Valmaseda-Castellón has a patent “Biofilm collector abutment” pending to Mozo-Grau, Rui Figueiredo, and Eduard Valmaseda-Castellón. Dr. Cortés-Acha reports grants from the Faculty of Dentistry, University of Barcelona (Spain) and non-financial support from Mozo-Grau (Valladolid, Spain) during conduct of the study. The present research was conducted by the Dental and Maxillofacial Pathology and Therapeutics research group at the IDIBELL Institute (L'Hospitalet de Llobregat, Spain) and funded by a postgraduate research grant from the Faculty of Dentistry, University of Barcelona (€4.560).

REFERENCES

1. Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C. Prevalence of peri-implant diseases. A cross-sectional study based on a private practice environment. *J Clin Periodontol* 2012;39:490-494.
2. Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: A review of the literature. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:1-19.
3. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol* 2012;27:409-419.
4. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
5. Murray JL, Connell JL, Stacy A, Turner KH, Whiteley M. Mechanisms of synergy in polymicrobial infections. *J Microbiol* 2014;52:188-199.
6. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Favari M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:975-982.
7. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated

- with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol* 2012;39:425-433.
8. Zheng H, Xu L, Wang Z, et al. Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental implants. *Sci Rep* 2015;5:10948.
 9. Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of “pristine” peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:25-37.
 10. Renvert S, Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Renvert H, Rutger Persson G. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:509-516.
 11. Gerber J, Wenaweser D, Heitz-Mayfield L, Lang NP, Persson GR. Comparison of bacterial plaque samples from titanium implant and tooth surfaces by different methods. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:1-7.
 12. ASA House of Delegates. American Society of Anesthesiologists – ASA Physical Status Classification System. Available at: <http://www.asahq.org/resources/clinical-information/asa-physical-status-classification-system>. Accessed April 20, 2017.
 13. Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E Jr., Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2:145-151.
 14. García-García M, Mir-Mari J, Benic GI, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E. Accuracy of periapical radiography in assessing bone level in implants affected by peri-implantitis: A cross-sectional study. *J Clin Periodontol* 2016;43:85-91.
 15. Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group. 16S 454 Sequencing Protocol HMP Consortium 2010. Available at: http://www.hmpdacc.org/doc/16S_Sequencing_SOP_4.2.2.pdf. Accessed January 25, 2016.
 16. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 2011;27:863-864.
 17. Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, et al. The metagenomics RAST server – A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 2008;9:386.
 18. Gomez-Alvarez V, Teal TK, Schmidt TM. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. *ISME J* 2009;3:1314-1317.
 19. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:5261-5267.
 20. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, et al. The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D141-D145.
 21. Futami R, Muñoz-Pomer A, Viu JM, et al. GPRO: The professional tool for management, functional analysis and annotation of omic sequences and databases. *Biotechnologia Bioinforma* 2011;1:1-5.
 22. Chen J, Bittinger K, Charlson ES, et al. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics* 2012;28:2106-2113.
 23. Chen T, Yu W-H, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: A Web Accessible Resource for Investigating Oral Microbe Taxonomic and Genomic Information. Database (Oxford) 2010;2010:baq013.
 24. OSU CORE Database, Oral Microbiome. Available at: <http://microbiome.osu.edu/sequences>. Accessed November 21, 2016.
 25. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 2006;17 (Suppl. 2):68-81.
 26. Renvert S, Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Renvert H, Rutger Persson G. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:509-516.
 27. Dabdoub SM, Tsigarida AA, Kumar PS. Patient-specific analysis of periodontal and peri-implant microbiomes. *J Dent Res* 2013;92(Suppl. 12):168S-175S.
 28. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* 2003;11:94-100.
 29. Neilands J, Wickström C, Kinnby B, et al. Bacterial profiles and proteolytic activity in peri-implantitis versus healthy sites. *Anaerobe* 2015;35(Pt A):28-34.
 30. da Silva ES, Feres M, Figueiredo LC, Shibli JA, Ramiro FS, Faveri M. Microbiological diversity of peri-implantitis biofilm by Sanger sequencing. *Clin Oral Implants Res* 2014;25:1192-1199.
 31. Tamura N, Ochi M, Miyakawa H, Nakazawa F. Analysis of bacterial flora associated with peri-implantitis using obligate anaerobic culture technique and 16S rDNA gene sequence. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013;28:1521-1529.
 32. Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res* 2014;16:783-793.
 33. Eick S, Ramseier CA, Rothenberger K, Brägger U, Buser D, Salvi GE. Microbiota at teeth and implants in partially edentulous patients. A 10-year retrospective study. *Clin Oral Implants Res* 2016;27:218-225.
 34. Quirynen M, De Soete M, Dierckx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 2001;28:499-507.
 35. Stingu C-S, Eschrich K, Rodloff AC, Schaumann R, Jentsch H. Periodontitis is associated with a loss of colonization by *Streptococcus sanguinis*. *J Med Microbiol* 2008;57:495-499.
 36. Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Diversity and morphology of members of the phylum “synergistetes” in periodontal health and disease. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:3777-3786.
 37. Ang MY, Dutta A, Wee WY, Dymock D, Paterson IC, Choo SW. Comparative genome analysis of *Fusobacterium nucleatum*. *Genome Biol Evol* 2016;8:2928-2938.
 38. Metzger Z, Lin Y-Y, Dimeo F, Ambrose WW, Trope M, Arnold RR. Synergistic pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in the mouse subcutaneous chamber model. *J Endod* 2009;35:86-94.
 39. Heuer W, Elter C, Demling A, et al. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehabil* 2007;34:377-382.
 40. Cosgarea R, Dannewitz B, Sculean A, et al. Bacterial and inflammatory behavior of implants in the early healing phase of chronic periodontitis. *Quintessence Int* 2012;43:491-501.
 41. Heuer W, Kettenring A, Stumpp SN, et al. Metagenomic analysis of the peri-implant and periodontal microflora

- in patients with clinical signs of gingivitis or mucositis. *Clin Oral Investig* 2012;16:843-850.
42. Vered Y, Zini A, Mann J, et al. Teeth and implant surroundings: Clinical health indices and microbiologic parameters. *Quintessence Int* 2011;42:339-344.
 43. Cortelli SC, Cortelli JR, Romeiro RL, et al. Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses. *Arch Oral Biol* 2013;58:67-74.
 44. Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett* 2014;162(2 Pt A):22-38.
 45. Yamanaka W, Takeshita T, Shibata Y, et al. Compositional stability of a salivary bacterial population against supragingival microbiota shift following periodontal therapy. *PLoS One* 2012;7:e42806.
 46. van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJ, de Graaff J. *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis*: Its role in endodontal infections. *J Endod* 1992;18:431-434.
 47. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Prevalence of new candidate pathogens *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* and as-yet-uncultivated *Bacteroidetes* clone X083 in primary endodontic infections. *J Endod* 2009;35:1359-1362.
 48. Wu C. Human microbiome, *Actinobacteria*. In: Nelson KA, ed. *Encyclopedia of Metagenomics*. New York: Springer New York; 2013:1-7.
 49. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, et al. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:352-362.
 50. van der Horst J, Buijs MJ, Laine ML, et al. Sterile paper points as a bacterial DNA-contamination source in microbiome profiles of clinical samples. *J Dent* 2013;41:1297-1301.
 51. Elter C, Heuer W, Demling A, et al. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23:327-334.
- Correspondence: Dr. Rui Figueiredo, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, Bellvitge Campus, Pavello de Govern 2a planta, Despatx 2.9, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain. E-mail: ruifigueiredo@hotmail.com.
- Submitted January 21, 2017; accepted for publication April 28, 2017.

2. ESTUDIO II

DEVELOPMENT AND VIABILITY OF BIOFILMS GROWN ON EXPERIMENTAL ABUTMENTS MIMICKING DENTAL IMPLANTS: AN IN VIVO MODEL

- Autores: *Cortés-Acha B, Figueiredo R, Blanc V, Soler-Ollé A, León R, Valmaseda-Castellón E.*
 - Título: *Development and viability of biofilms grown on experimental abutments mimicking dental implants: an in vivo model*
 - Revista: *Medicina Oral, Patología Oral, Cirugía Bucal*
 - Factor de impacto: *1.671*
 - Posición: *41/91 (2º cuartil)*
 - Referencia completa: *Cortés-Acha B, Figueiredo R, Blanc V, Soler-Ollé A, León R, Valmaseda-Castellón E. Development and viability of biofilms grown on experimental abutments mimicking dental implants: an in vivo model. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2019.*
 - Doi: ____
-

Fecha de envío: 12/11/2018

Fecha de aceptación: 06/05/2019

Fecha de publicación: ____

Objetivo

Determinar si un pilar con una estructura macro y microscópica similar a la de un implante permite recoger y estudiar el biofilm formado sobre la superficie de implantes expuestos en la cavidad oral.

Material y método

Se realizó un estudio experimental no randomizado que incluía un total de 15 pacientes portadores de al menos un implante colocado en el Hospital Odontológico de la Universitat de Barcelona (UB).

Se siguieron las guías CONSORT (184) y se cumplieron las recomendaciones de la declaración de Helsinki (185). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Odontológico de la Universitat de Barcelona (número de registro 488 adjuntado en anexos) y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado antes de ser incluidos en el estudio.

Los criterios de inclusión y exclusión fueron ya previamente descritos en el primer estudio (186). En resumen, se excluyeron los pacientes que hubieran tomado cualquier antibiótico o antiséptico durante el periodo de estudio o durante los 30 días previos a la inclusión de este, y los pacientes fueron instruidos para no higienizar la zona del pilar. Los participantes podían cepillar el resto de los dientes y/o implantes, pero sin usar pasta dentífrica. Una vez se colocó el pilar (figura 28), se marcó la en la zona oclusal con una fresa de diamante para determinar la cara vestibular, y se contó el número de espiras que quedaban supragingivales. Aquellos pacientes con enfermedad periodontal activa o no controlada fueron excluidos. Los pacientes con enfermedad periodontal fueron incluidos únicamente si la enfermedad estaba controlada (profundidades de sondaje ≤ 4 mm y sin sangrado al sondaje en más del 30% de las localizaciones).



Figura 28. Pilares experimentales colocados en boca.

Tras 14 días, se retiró el pilar y se llevó a los laboratorios del centro de I+D de Dentaid (Dentaid SL, Cerdanyola del Vallés, Barcelona, España) en un tubo estéril cerrado

rellenado con saliva del propio paciente en una nevera a 4°C. Se fijó un análogo de implante en el interior del tubo para que fuera posible transportar el pilar sin que este tocara las paredes (figura 24b). De esta forma, se evitó la modificación de la estructura del biofilm. El biofilm de los primeros 5 pilares se estudió bajo el método de tinción fluorescente usando ácido nucleico SYTO9 (Molecular Probes, Eugene, EE. UU.). Se colocaron los pilares inmersos en una solución de 0.02mM de SYTO9 durante 10 minutos a temperatura ambiente, evitando la exposición lumínica, después se aclararon con una solución salina (phosphate-buffered saline, PBS) y se examinaron con un laser confocal de microscopia electrónica (CLSM) (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) a una magnificación de 10X (figura 29). El laser blanco se fijó a 482 nm con unas bandas de emisión de entre 500 y 540 nm. El uso de esta tecnología, junto con la tinción previa de los biofilms, permitió estudiar el grosor y grado de cobertura de las superficies. La capacidad de penetración en la muestra aportada por el láser proporcionó información de fluorescencia de cada campo focal, lo que, a su vez, permitió a posteriori generar imágenes tridimensionales de los biofilms (figura 30). Se empleó un objetivo seco de 10X. Las imágenes presentaron un tamaño de píxel de 1.52x1.52 µm.

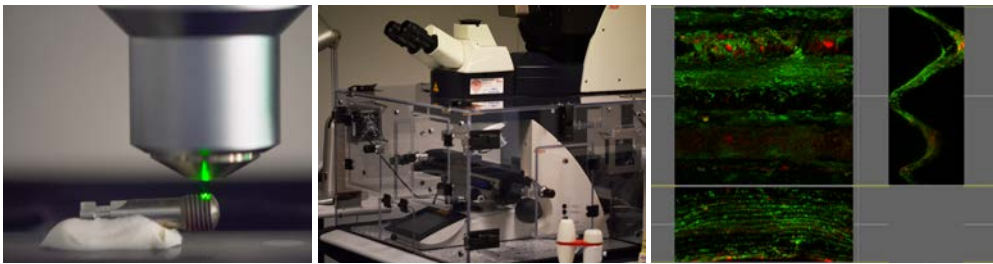


Figura 29. Microscopio confocal e imagen captada por éste a través de su programa de ordenador.

Después, con el objeto de estudiar tanto el recubrimiento como la vitalidad del biofilm (la proporción de células vivas y células muertas en toda la biomasa), se estudiaron 10 pilares más utilizando la tinción LIVE & DEAD Backlight Bacterial Viability Kit, L7012 (Molecular Probes, Eugene, EE. UU.) (figura 31).

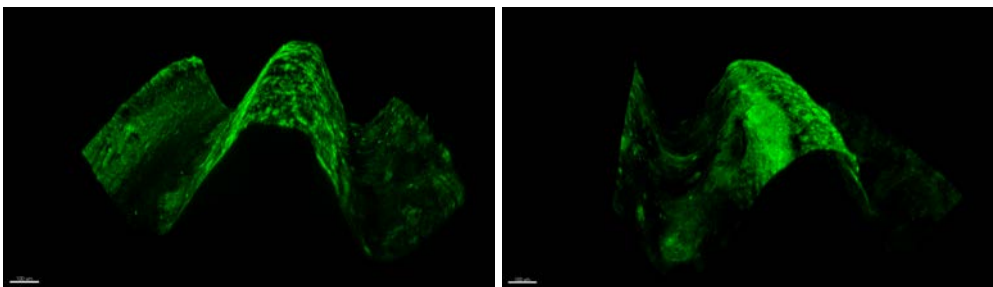


Figura 30. Reconstrucción 3D de imagen obtenida con microscopio confocal. Biofilm teñido con SYTO9.

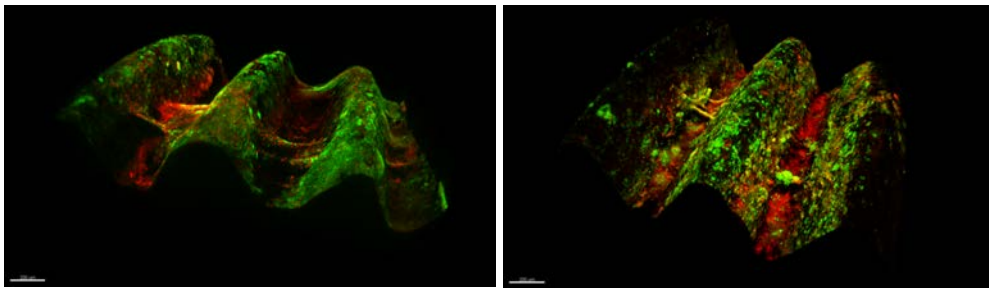


Figura 31. Reconstrucción 3D de imagen obtenida con microscopio confocal. Biofilm teñido con Live&Dead Backlight (en verde bacterias vivas y en rojo bacterias muertas).

La combinación de dos fluoróforos en este kit permite determinar la viabilidad de poblaciones bacterianas en función de la integridad de la membrana plasmática. El fluoróforo SYTO9 es capaz de atravesar la membrana bacteriana por difusión pasiva e interactuar con la doble hebra de ADN. Tras esta unión, la fluorescencia emitida en verde de este marcador, muy leve cuando está libre, se potencia enormemente. El yoduro de propidio es una molécula de mayor tamaño que no puede entrar al citoplasma por difusión pasiva, pero sí es capaz de penetrar en las células cuya membrana está comprometida, lo cual es indicativo de muerte celular. Éste se intercala en el ADN cada cuatro o cinco pares de bases. La unión potencia la emisión de fluorescencia hasta en treinta veces en comparación con su fluorescencia basal. Cuando ambos marcadores están presentes, el yoduro de propidio presenta mayor afinidad por el ADN que el SYTO9, que es desplazado (187). El uso de esta tinción no solo permite trabajar con eubacterias, sino también con arqueas o células eucariotas vivas y/o muertas del biofilm. De color verde se marcarán aquellos microorganismos vivos y en rojo los muertos (figura 31).

Así, se colocaron los pilares inmersos en una solución con proporciones equivalentes de tinción SYTO9 (0.02 mM) y tinción de yoduro de propidio (0.12 nM) diluido en PBS e incubado en las condiciones previamente descritas. El laser blanco se fijó a 482 nm para el SYTO9 y a 514 nm para el yoduro de propidio. Las bandas de emisión fueron 500 a 540 nm y 570 a 700 nm respectivamente. Dos lados (vestibular y lingual/palatino) y tres áreas por lado (supragingival, intermedio y subgingival) fueron observadas a una magnificación de 10X.

El área del biofilm fue cuantificada usando el programa MetaMorph® v1.5 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, EE. UU.). Fueron cuantificadas cinco regiones de interés (ROI) seleccionadas siempre en la misma posición relativa y usando el máximo de proyecciones obtenidas por cada campo. Las reconstrucciones 2D y 3D se realizaron usando el programa Imaris® v.7.1 (Bitplane AG, Badenerstrasse, Zurich, Suiza).

Finalizado este proceso, todos los pilares se fijaron con una solución al 3.5% de formaldehído y fueron observados bajo microscopía electrónica de barrido (figura32) (SEM; Merlin FE-SEM®, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) a una magnificación de 56X y 100X.



Figura 32. Microscopio electrónico de barrido y la imagen del programa de ordenador.

La utilización del microscopio electrónico de barrido (SEM) permitió obtener información morfológica y topográfica de los biofilms crecidos sobre la superficie de los pilares. Su tecnología consiste en enfocar sobre la muestra previamente deshidratada, un fino haz de electrones acelerado con energías de excitación desde 0.1kV hasta 30kV. El haz se desplaza sobre la superficie de la muestra realizando un barrido que obedece a una trayectoria de líneas paralelas. La interacción del haz de electrones con la muestra produce diversas señales (electrones secundarios, electrones retro-dispersados, emisión de rayos X, etc.), que son recogidas por distintos detectores; éstos permiten la observación y la producción de imágenes de alta resolución (de hasta 3 nm). En el presente estudio, las imágenes se generaron mediante la detección de electrones secundarios.

Análisis estadístico

Los datos se procesaron usando el programa IBM SPSS 22.0 (IBM, Nueva York, EE. UU.). Puesto que la muestra era pequeña se decidió calcular las medianas y los rangos intercuartiles (IQR) para todas las variables escala. Todas las ROI tenían la misma área. Se calculó el área total de la ROI que estaba cubierta por biofilm. El test de Wilcoxon para datos pareados se usó para comparar el recubrimiento de la superficie del pilar (supragingival vs. subgingival, vestibular vs. lingual/palatino y vivas vs. muertas). Las diferencias en cuanto al recubrimiento entre pacientes con o sin antecedentes de periodontitis se hizo utilizando el test de Mann-Whitney. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

Resultados

Los 5 primeros pilares teñidos con SYTO9 y estudiados con CLSM se obtuvieron de 3 hombres y 2 mujeres con una mediana de edad de 59 años (IQR = 13.5 años). Se observó un biofilm que cubría la totalidad de la superficie. El SEM mostró un biofilm grueso con un alto recubrimiento en la parte supragingival del pilar. La biomasa que cubría la superficie incluía además de bacterias, numerosas células epiteliales (figura 33), sobretodo en la porción subgingival.

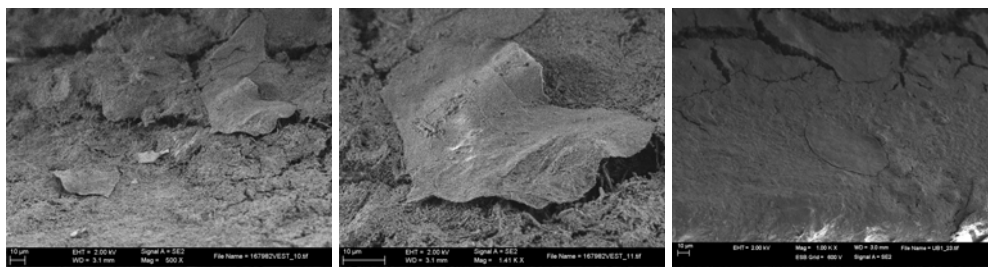


Figura 33. Células epiteliales posdas sobre el biofilm vistas con el SEM.

La figura 34 muestra el resultado obtenido de los 10 pilares en los que se estudió la vitalidad. Estos pilares se colocaron en 10 mujeres no fumadoras con una mediana de edad de 59 años (IQR = 15 años). Cinco sujetos eran sanos periodontalmente y 5 tenían antecedentes de periodontitis. La tabla 10 resume los datos clínicos recogidos en cada paciente. El 38% de la superficie supragingival del pilar y el 21% de la superficie subgingival estaba cubierta por biofilm ($p=0.013$). En números absolutos, el recubrimiento fue también mayor en el área supragingival tanto para bacterias vivas ($p=0.047$) como para muertas ($p=0.028$). En cuanto a la vitalidad del biofilm, el número de células vivas superaba el número de muertas en la zona supragingival ($p=0.005$) pero no en la zona subgingival ($p=0.203$). El porcentaje de células vivas encontrado en la zona supragingival (51.12%) era mayor que el porcentaje encontrado en la zona subgingival (19.95%, $p=0.017$). De la misma manera, el porcentaje de células muertas fue mayor en la zona supragingival (25.86%) que en la zona subgingival (19.22% $p=0.022$) (imagen de bacterias vivas y muertas en figura 34). La ratio de bacterias vivas/muertas fue mayor en la porción supragingival que en la subgingival pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (1.97 vs. 1.41, $p=0.074$) (figura 36).

Paciente	(P1)	(P2)	(P3)	(P4)	(P5)	(P6)	(P7)	(P8)	(P9)
Edad	42	68	59	65	81	53	32	73	54
Estado de salud	HTA	HTA, Hipercolesterolemia, artrosis, fibromialgia, arritmia, diabetes II, ACV	Plaquetopenia idiopática	Colesterol, Diabetes II	HTA	Artritis	No	No	Diabetes I HTA
Cigarrillos/día	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Estado periodontal	Sano	Enfermo	Sano	Sano	Sano	Enfermo	Sano	Enfermo	Enfermo
Posición del implante	46	43	36	45	17	45	15	24	14
Distancia con adyacentes	I-7-x-6-D	I-7-X-2-D	D-6-X-3-I	D-4-X-5-D	I-2-X-libre	I-2-X-4-D	D-1,5-X-3-D	D-4-X-6-I	I-4-X-6-D
Encía queratinizada	2mm	4mm	1mm	4mm	5mm	5mm	6mm	2mm	4mm
Prótesis	Pt	Pt	Pt	U	Pt	Pt	U	Pt	Pt
PPI	0	0	0	0	0	1	2	1	0
PSBI	0	0	0	0	0	1	0	1	0
PPD	3	1	2	3	1	3	3	3	3

Tabla 10. Datos recogidos de los 10 últimos pilares. Todos los individuos fueron mujeres. Distancia con adyacentes: de x (pilar de estudio) al diente (D) o implante (I) contiguo o extremos libre (libre). Prótesis tipo puente (Pt) o unitaria (U).

No se encontraron diferencias significativas en cuanto al recubrimiento del biofilm entre vestibular y lingual/palatino. Asimismo, los pacientes con o sin antecedentes de periodontitis tuvieron resultados similares.

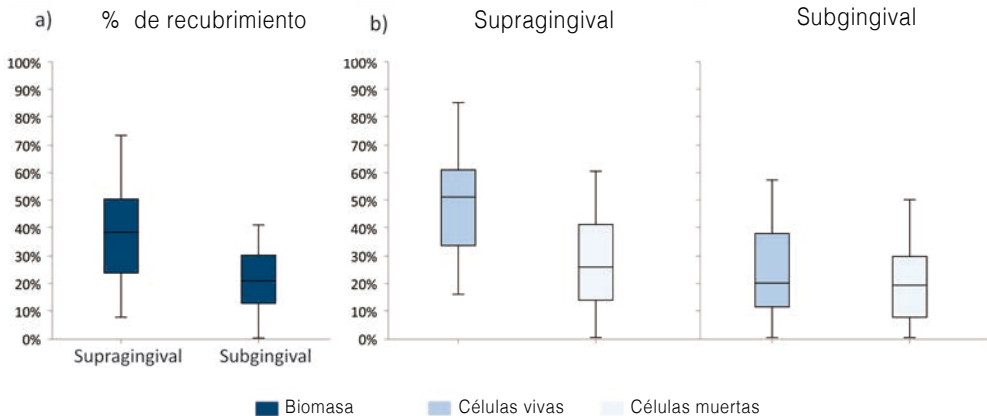


Figura 34. Porcentaje de recubrimiento de la superficie del pilar.

Los 10 últimos pilares se observaron también a través del SEM (figuras 37 a 40). La porción supragingival mostró una mayor colonización mientras que en la porción subgingival se encontraron numerosas células epiteliales (figura 37). Mediante el SEM se observa esa extensa colonización y el grosor de la biomasa sobretudo en las zonas entre espiras (figura 39) donde no podemos llegar a ver la superficie original del pilar (figura 38).

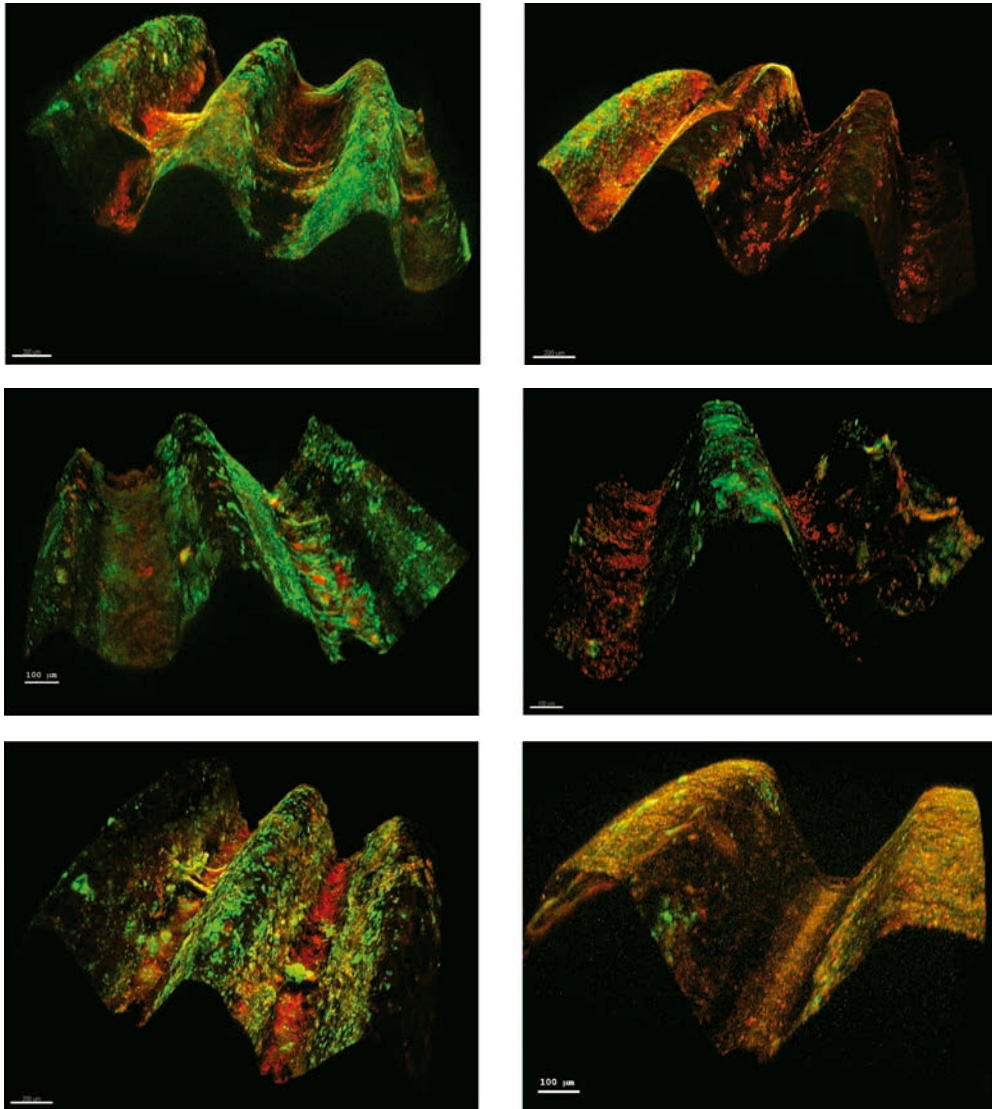


Figura 35. Figura donde se aprecian las reconstrucciones 3D de los biofilms estudiados.

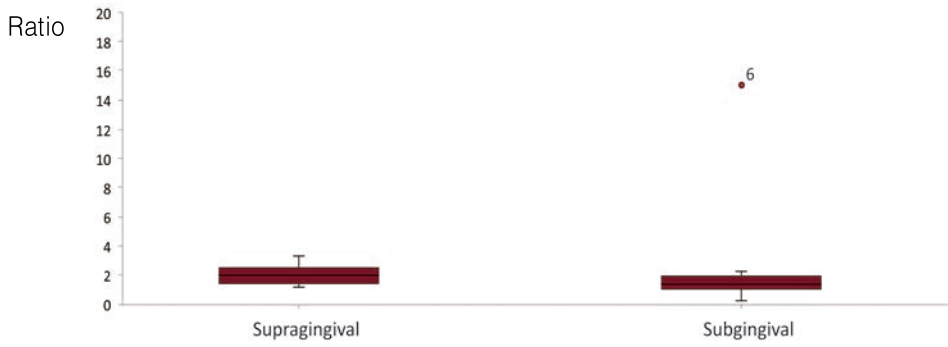


Figura 36. Ratio de bacterias vivas y muertas en las zonas supra y subgingival.

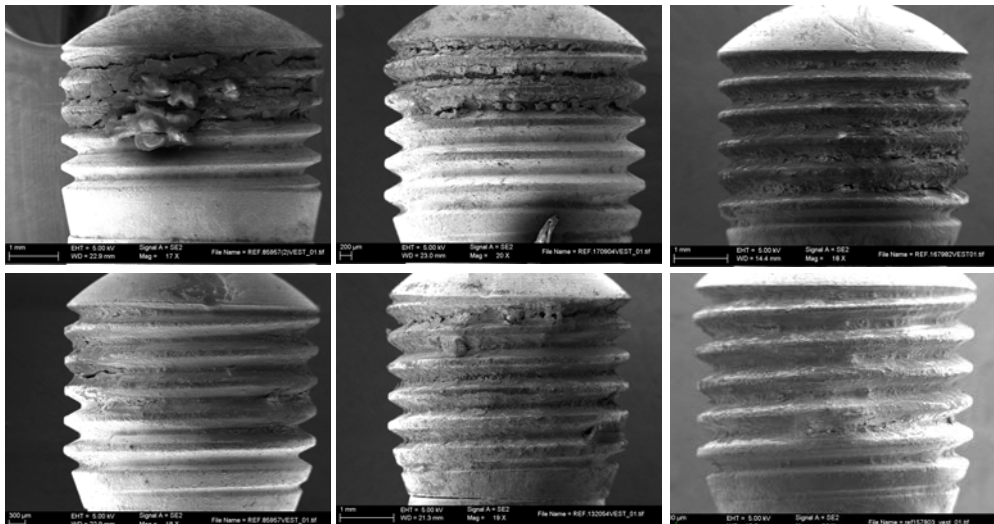


Figura 37. Imágenes obtenidas con el SEM de 5 pilares donde se intuye el área supragingival y subgingival.

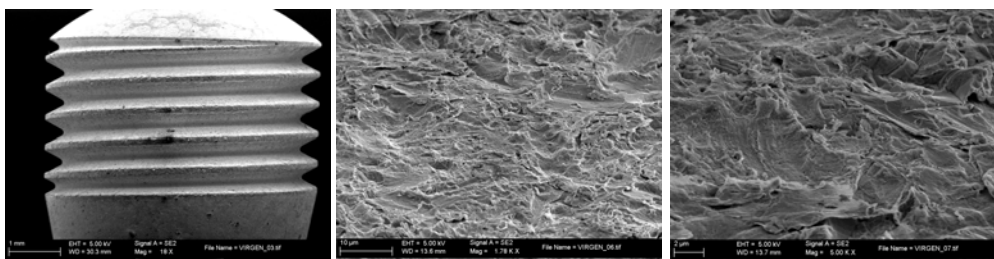


Figura 38. Imágenes obtenidas con el SEM de un pilar original intacto.

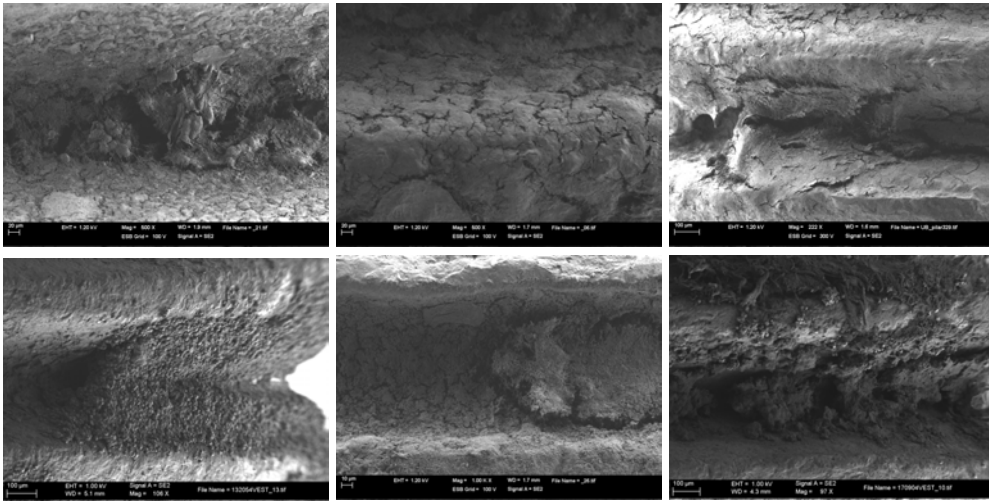


Figura 39. Imágenes obtenidas con el SEM donde se aprecia con detalle la colonización que se produce en los valles, es decir, entre las espiras del pilar.

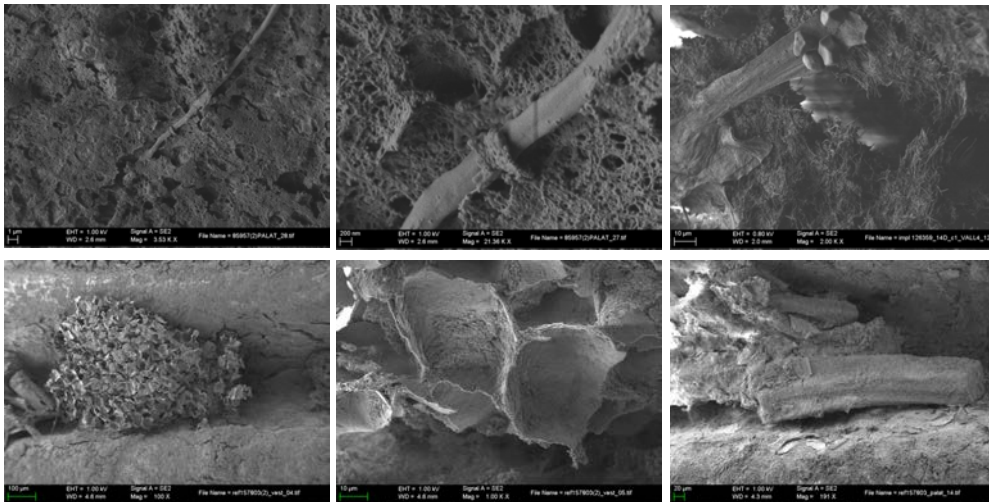


Figura 40. Distintas estructuras identificadas con morfología atípica formando parte del biofilm encontrado sobre las pilares mediante SEM.

Development and viability of biofilms grown on experimental abutments mimicking dental implants: an in vivo model.

Running Title: Biofilm grown on dental implants.

Berta Cortés-Acha¹
Rui Figueiredo²
Vanessa Blanc³
Agnès Soler-Ollé⁴
Ruben León⁵
Eduard Valmaseda-Castellón⁶

¹ DDS, MS, PhD. Faculty of Medicine and Health Sciences of the University of Barcelona (Spain).

² DDS, MS, PhD. Adjunct professor. Oral Surgery and Implantology Department, Faculty of Medicine and Health Sciences of the University of Barcelona. Researcher at the IDIBELL Institute, Barcelona (Spain)

³ MS, PhD. Microbiology Department Director. Dentaid Research Center, Cerdanyola del Vallés, Barcelona (Cerdanyola del Vallés, 08290, Spain), E-mail: blanc@dentaid.es

⁴ MS. Microbiology Department Researcher. Dentaid (Cerdanyola del Vallés, 08290, Spain), E-mail: agnes.soler@dentaid.es

⁵ MS, PhD. R&D Manager. Dentaid Research Center, Cerdanyola de Vallés, Barcelona (Cerdanyola del Vallés, 08290, Spain), E-mail: leon@dentaid.es

⁶ MS, PhD. Associate professor. Oral Surgery and Implantology Department, Faculty of Medicine and Health Sciences of the University of Barcelona. Researcher at the IDIBELL Institute, Barcelona (Spain), E-mail: eduardvalmaseda@ub.edu

Corresponding Author:

Dr. Rui Figueiredo
Faculty of Medicine and Health Sciences - University of Barcelona
Campus de Bellvitge UB; Facultat de Medicina i Ciències de la Salut (Odontologia)
C/ Feixa Llarga, s/n; Pavelló Govern, 2^a planta, Despatx 2.9
08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona (Spain).
Tel: +34 93 402 42 74; E-mail: rui@ruiibf.com

Abstract

Objective: To determine whether an experimental abutment mimicking the macro- and microstructure of a dental implant is a suitable method for recovering biofilm, and to describe the features of biofilms formed around such abutments on healthy implants.

Study design: Experimental abutments were used in 15 patients without peri-implant diseases. After 14 days' absence of dental hygiene in this area, the abutments were retrieved and analyzed through confocal laser scanning microscopy and with a scanning electron microscope. The biofilm formation on the surface of the first 5 abutments was determined by a fluorescence-staining method using SYTO9 nucleic acid stain. In order to study the biofilm's coverage and vitality, 10 additional abutments were assessed using a live & dead bacterial viability. Descriptive and bivariate analyses of the data were performed.

Results: A global plaque coverage of the abutments was observed in all cases. The submucosal area of the abutment was mostly covered with biofilm (over 21%). Moreover, significant differences between supra- and subgingival locations were detected. The ratio of live to dead bacteria was slightly higher in the supragingival portion of the abutment than in the subgingival part ($p < 0.074$).

Conclusions: This *in vivo* experimental model allows observing with detail the extensive plaque growth in exposed experimental abutments mimicking dental implants when hygiene measures are absent. The biofilm coverage area is significantly higher in the supragingival zone than in the subgingival portion.

Key Words: *dental implants, biofilm, peri-implant diseases*

Introduction

Since Brånemark defined osseointegration in the mid-1960s (1), oral rehabilitation has changed dramatically due to the introduction of dental implants. Although implant survival rates are generally very high (2), the prevalence of long-term biological complications is considerable (3,4). Peri-implantitis has been defined by some authors as an infectious chronic disease that affects osseointegrated functional implants (5), in which colonizing bacteria forming a biofilm seem to play a very important role (6). Other variables like a history of periodontal diseases, poor oral hygiene or smoking habits also influence the progress of this complication (7).

A dental biofilm has been described as a microbial community grown on teeth surfaces or any other hard non-shedding material. Immediately following the immersion of a hard surface into the oral cavity fluids, adsorption of macromolecules leads to the formation of a conditioning film, also known as acquired pellicle. This is formed by a variety of salivary glycoproteins (mucins, phosphoproteins, proline-rich and histidine-rich proteins), enzymes and other molecules that alter the charge and free energy of the surface, facilitating bacterial adhesion (8). After early colonizers (i.e. streptococcal and actinomyces species) have bound to the pellicle, the adhesion of secondary microorganisms takes place and the structure of the biofilm becomes thicker. Thick biofilms are characterized by poor oxygen diffusion in the deeper layers, which leads to the formation of a completely anaerobic environment. At this stage, the third set of colonizers — considered periodontopathogenic oral microorganisms — becomes established.

When bone loss occurs due to either remodelling or inflammation (e.g. peri-implantitis), the implant surface becomes exposed to the oral cavity and, as mentioned previously, salivary biopolymers attach to the implant surface. This can eventually lead to the formation of a pathogenic biofilm (9-13). The macro- and microstructure of the dental implants (presence of threads and rough surfaces) probably enhances this attachment, favoring peri-implant tissue inflammation.

Most of the available data on bacterial colonization and biofilm formation in dental implants are based on the analysis of

titanium discs placed in splints (14-17). In the opinion of the present authors, this method has important limitations, since it does not reproduce a real clinical situation. Indeed, the biofilm samples collected with titanium discs only recover supra-mucosal biofilm, mainly composed of aerobic and microaerophilic microorganisms. This drawback is especially relevant since the subgingival area presents a favorable environment for the growth of more pathological bacteria. Other authors have proposed using removed failed implants, since this allows the study of the biofilm's structure (18,19). However, this method does not allow the initial phase of bacterial colonization to be analyzed. Finally, some reports have used healing abutments with different degrees of roughness to study biofilm formation (9,20,21). Nevertheless, these abutments did not reproduce the geometry and surfaces of dental implants. In the present authors' opinion, the surface roughness (microstructure) and threads (macrostructure) of the implants are very important variables since they probably enhance plaque formation and complicate dental hygiene. Therefore, an experimental model that uses removable abutments which replicate exposed dental implants (with its supra and subgingival areas) is of great interest, since it would allow intact biofilms formed over implants to be recovered. Moreover, this procedure is non-invasive and can be used in implants with or without a pathology (Fig. 1).

The aims of the present work were to evaluate whether a custom-made abutment with the same macro- and microstructure as a dental implant is a suitable method for recovering biofilm; and to analyze the features of a biofilm formed on healthy dental implants after 14 days without oral hygiene measures.

Material and Methods

A non-randomized experimental study was conducted in a total of 15 subjects that had at least one dental implant placed in the Dental Hospital of the University of Barcelona (Spain).

The CONSORT statement guidelines (22) were used as a reference to report this study, which complied with the Helsinki declaration. The protocol was submitted to and approved by the Ethical Committee for Clinical Research (CEIC) of the Dental Hospital of the University of Barcelona (registered number 488) and all the patients signed an informed consent form before enrollment.

The inclusion/exclusion criteria and the description of the abutments used have been defined in a previous publication (23). Briefly, patients were excluded if any antibiotics or antiseptic mouthwashes were used during the study or in the previous 30 days, and the selected subjects were instructed not to use any oral hygiene measure over the abutment area. The participants could brush or floss the rest of the implants or teeth, but without toothpaste. Once the abutment was placed (Fig. 1), the buccal area was marked using a diamond bur, and the number of exposed threads was recorded for later analysis. Participants with active periodontal disease were excluded. Periodontal patients were only included if the disease was considered under control, with a pocket probing depth (PPD) of ≤ 4 mm and no bleeding on probing (BOP) at over 30% of the sites.

After 14 days, the abutment was removed and sent in a sterile snap tube with saliva at 4°C to the microbiology facilities of the Dentaaid Research Center (Dentaaid SL, Cerdanyola del Vallés, Barcelona, Spain). The abutment was screwed to an implant analogue inside the snap tube. This was done to avoid the abutment's touching any surface, thus avoiding biofilm disruption. The biofilm formation on the surface of the first 5 abutments was determined by a fluorescence-staining method using SYTO9 nucleic acid stain (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The abutments were immersed in 0.02 mM SYTO9 for 10 minutes at room temperature, avoiding exposure to light, then they were rinsed once with phosphate-buffered saline (PBS) and were examined under 10X magnification, using a Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). The white laser was set at 482 nm with emission bands between 500 to 540 nm.

Afterwards, in order to study the biofilm's coverage and vitality (meaning the proportion of live and dead cells in the whole biomass), 10 additional abutments were assessed using the LIVE & DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, L7012 (Molecular

Probes, Eugene, OR, USA). The abutments were immersed in equal volumes of SYTO9 (0.02 mM) dye and propidium iodide (PI) (0.12 mM) dye diluted in PBS, and the mixture was incubated under the aforementioned conditions. The white laser was set at 482 nm for SYTO9 and at 514 nm for propidium iodide, the emission bands being 500 to 540 nm and 570 to 700 nm, respectively. Two sides (buccal and palatal/lingual) and three fields per side (supragingival, intermediate and subgingival) were observed under 10X magnification.

The biofilm area was quantified using MetaMorph⁺ v1.5 software (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA). Five regions of interest (ROI), always selected in the same relative position, were quantified using the maximum projections obtained from each field. The 2D and 3D reconstruction was performed using Imaris⁺ v.7.1 software (Bitplane AG, Badenerstrasse, Zurich, Switzerland).

Afterwards, all the abutments were fixed in a 3.5% formaldehyde solution, vacuum-dried and observed through the scanning electron microscope (SEM; Merlin FE-SEM⁺, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at 56X and 100X.

Statistical Analysis

The data were processed using IBM SPSS 22.0 software (IBM, New York, USA). Since the sample size was limited, median and interquartile range (IQR) were calculated for all the scale variables. All the ROI had the same area. The total area of the ROI that was covered with biofilm was calculated. The Wilcoxon signed rank test for paired data was used to compare the coverage of the surface of the abutment (supragingival vs. subgingival, buccal vs. lingual and live vs. dead cells). Differences in coverage between patients with and without a history of periodontal disease were assessed with the Mann-Whitney U test. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

The first 5 abutments stained with SYTO9 and observed through CLSM were retrieved from 3 men and 2 women with a median age of 59 (IQR=13,5 years). A biofilm covering the entire surface of the abutments was observed. SEM disclosed a thick biofilm with high coverage in the supragingival portion of the abutment. The biomass covering the abutments included bacteria and also epithelial cells, especially in the subgingival portion (Fig. 2.1).

Figure 2.2 shows the results of the 10 abutments that were assessed for vitality (meaning the proportion of live and dead cells in the whole biomass). The abutments were placed in 10 non-smoking women with a median age of 59 years (IQR=15 years). Five subjects were periodontally healthy and 5 had a history of periodontitis. Table 1 summarizes the main clinical features of the included participants.

Thirty-eight percent of the supragingival surface of the abutment and 21% of the subgingival area were covered with biofilm ($p = 0.013$) (Fig. 2.2a). In absolute numbers also, the coverage was greater in the supragingival portions for both live ($p = 0.047$) and dead bacteria ($p = 0.028$).

Regarding the vitality of the biofilm, live cells significantly outnumbered dead ones supragingivally ($p = 0.005$) but not subgingivally ($p = 0.203$) (Fig. 2.2b). The percentage of live cells found supragingivally (51.12%) was greater than the percentage found on the subgingival part of the abutment (19.95%, $p = 0.017$). Also, the percentage of dead cells was greater supragingivally (25.86%) than subgingivally (19.22%, $p = 0.022$) (Fig. 3). The ratio of live to dead bacteria was higher in the supragingival portion of the abutment than in the subgingival part but the difference was not statistically significant (1.97 vs. 1.41 ; $p = 0.074$).

No significant differences were found regarding the biofilm-covered area between buccal and palatal/lingual areas. Likewise,

periodontally-healthy participants and patients with history of periodontitis had similar outcomes.

Oral biofilms colonizing the entire surface of the abutments was also observed through SEM in the last 10 abutments. The supragingival portion showed a higher colonization whereas in the subgingival area the observation of epithelial cells was a common find (Fig. 2.1d, Fig. 2.1e).

Discussion

Biofilm formation over implants or prosthetic components can play a significant role in the occurrence and progression of peri-implant diseases, just as biofilm formation on teeth is a risk factor for periodontal diseases (24,25). However, some important differences between periodontitis and peri-implantitis have been described. The biofilm formed around teeth has been well studied, especially its growth pattern and 3D structure. Nevertheless, the information available in the literature regarding the characteristics of biofilms formed over exposed implants is very scarce.

Mombelli et al. (26) described the microbiota associated with peri-implantitis and pointed out that most studies use techniques that destroy the three-dimensional architecture of the biofilms formed over dental implants (curettes or paper points). Therefore, a removable abutment mimicking a dental implant that allows biofilms to be collected without disruption may be of great interest for research purposes (Fig. 1).

Some authors have employed splints with discs made of titanium (or other materials) to collect biofilm (15,27,28). However, this method does not reproduce a real situation, since the disks are not partially included in a peri-implant sulcus. Indeed, the soft tissue may act as a protective factor (29). Some authors have studied *in vivo* biofilms using abutments with different surfaces (9,20,21). However, these abutments were either machined or had a roughness of no more than 0.9 μm . Moreover, their macroscopic appearance was quite different from that of a dental implant. The abutment employed in the present study had a roughness of 1.4-1.5 μm (similar to a commercial dental implant) and included threads which were similar to those of many implant systems. This experimental model made it possible to perform a 3D analysis of an intact 14-day-old *in vivo* biofilm formed over an exposed dental implant. Thus, this model can be used in the future to assess the efficacy of different biofilm removal methods.

The subgingival and supragingival areas showed different results in the present study. This can be explained by the assumption that keratinized mucosa surrounding healthy implants has the potential to prevent subgingival biofilm formation. Even so, approximately 20% of the subgingival portion of the abutments was covered by biofilm (Table 1). Elter et al. (20,21) studied the presence of a 14-day-old biofilm comparing the supragingival coverage area ($17.3 \pm 23.1\%$) with the subgingival area ($0.8 \pm 1.0\%$) on different abutments. Heuer et al. (9) presented similar data, with a coverage of $17.5 \pm 18.3\%$ in the supragingival area and $0.8 \pm 1.0\%$ of subgingival coverage. Other authors (30) even found a subgingival portion which was completely free of biofilm and colonized with epithelial cells. These studies seem to indicate that keratinized mucosa might be a good barrier when in contact with a smooth surface, avoiding the spread of microorganisms down into the subgingival area. Conversely, rough surfaces seem to be easily colonized by bacteria and this may explain why peri-implantitis can progress rapidly in exposed implants (after bone loss or bone remodeling processes). In these situations, bacteria will easily attach to the implant surface and the keratinized mucosa will not be able to avoid it. Our SEM images confirm this statement. In the present authors' opinion, the marked differences between the findings of the above-mentioned papers and the outcomes of the present study can be explained by the macro- and microstructure of the experimental abutment that simulates a real situation of an exposed dental implant.

Regarding the vitality of the biofilms analyzed, the live/dead bacteria ratio was slightly higher in the supragingival area than in the subgingival zone. The supragingival locations receive nutrients from the diet, which allow the biofilm to grow easily,

whereas the biofilm located on healthy subgingival locations receives a restricted amount of nutrients and oxygen. Since no previous studies have reported this finding, further research is needed to confirm these outcomes.

The strict inclusion/exclusion criteria and the study methodology (especially the number of visits required and the instructions to avoid oral hygiene measures) made patient enrollment quite difficult. This issue (i.e. reduced sample size) might be considered a limitation even though many studies have included a similar number of participants (9,20,21).

The clinical relevance that can be drawn from the present study is that after 14 days of exposure, the rough surface of a dental implant will be extensively covered by a mature biofilm (38% of the supragingival area and the 21% of the subgingival area). Therefore, the treatment of exposed dental implants should probably include a modification of the surface in order to reduce this fast and broad colonization.

The proposed in vivo model can be very useful in the future to compare the structure of biofilms formed over healthy and diseased implants and also to assess the efficacy of the different decontamination treatments that have been reported in the literature.

In conclusion, the use of removable experimental abutments mimicking exposed dental implants makes it possible to recover undisturbed biofilm that can be analyzed with both CLSM and SEM. Extensive plaque growth can be observed on these abutments after 14 days when hygiene measures are absent. The biofilm coverage area was significantly greater in the supragingival zone than in the subgingival portion.

Acknowledgements:

The authors would like to thank Mary Georgina Hardinge (Native British freelance translator, Valencia, Spain) for English language editing of the manuscript.

Funding and Conflict of interests:

The present research was partially funded with a research contract between the University of Barcelona and Mozo-Grau SA (number: 017199).

Dr. Figueiredo reports non-financial support from Mozo-Grau (Valladolid, Spain) and from Dentaïd SL (Cerdanyola del Vallès, Spain) during the conduct of the study. He also reports grants, personal fees and non-financial support from Mozo-Grau (Valladolid, Spain), grants from Mundipharma Research (Cambridge, United Kingdom), personal fees from BioHorizons Ibérica (Madrid, Spain), Inibsa Dental (Lliça de Vall, Spain), Dentsply implants Iberia (Barcelona, Spain) and ADIN Implants (Afula, Israel) outside the submitted work. In addition, Dr. Figueiredo, together with Mozo-Grau and Eduard Valmaseda-Castellón, has a registered patent for the "Biofilm collector abutment".

Dr. Valmaseda-Castellón reports non-financial support from Mozo-Grau and from Dentaïd SL during the conduct of the study. He also reports grants, personal fees and non-financial support from MozoGrau, personal fees from BioHorizons Ibérica, personal fees from Inibsa Dental, and personal fees from Dentsply implants Iberia outside the submitted work. In addition, Dr. Valmaseda-Castellón, together with Mozo-Grau and Rui Figueiredo, has a registered patent for the "Biofilm collector abutment".

Dr. Cortés-Acha reports non-financial support from Mozo-Grau and Dentaïd SL during the conduct of the study. Drs. Blanc, Soler-Ollé and León are researchers from the Dentaïd Research Center (Dentaïd, Cerdanyolla del Vallès, Spain).

The authors declare no other conflicts of interest regarding this study.

References

1. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1969;3:81-100.
2. Albrektsson T, Donos N. Implant survival and complications. The Third EAO consensus conference 2012. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23:63-5.
3. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol.* 2002;29:197-221.
4. Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C. Prevalence of peri-implant diseases. A cross-sectional study based on a private practice environment. *J Clin Periodontol.* 2012;39:490-4.
5. Lindhe J, Meyle J. Group D of european workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus report of the sixth european workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008;35:282-5.
6. Ericsson I, Berglundh T, Marinello C, Liljenberg B, Lindhe J. Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1992;3:99-103.
7. Heitz-Mayfield LJA, Mombelli A. The therapy of peri-implantitis: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014;29:325-45.
8. Teughels W, Assche N Van, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Imp Res.* 2006;17:68-81.
9. Heuer W, Elter C, Demling A, Neumann A, Suerbaum S, Hannig M et al. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehabil.* 2007;34:377-82.
10. Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction?. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014;16:155-65.
11. Canullo L, Lannello G, Peñarocha M, García B. Impact of implant diameter on bone level changes around platform switched implants: preliminary results of 18 months follow-up a prospective randomized match-paired controlled trial. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23:1142-6.
12. Chen L, Wen Y. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Int J Oral Sci.* 2011;3:66-73.
13. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song Z, Moser C, Jensen PØ et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci.* 2011;3:55-65.
14. Rasperini G, Maglione M, Cocconcelli P, Simion M. In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: a comparative microbiological and SEM analysis. *Clin Oral Implants Res.* 1998;9:357-64.
15. Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21:156-64.
16. Do Nascimento C, Da Rocha Aguiar C, Pita MS, Pedrazzi V, De Albuquerque RF, Ribeiro RF. Oral biofilm formation on the titanium and zirconia substrates. *Microsc Res Tech.* 2013;76:126-32.
17. Martínez-Hernández M, Olivares-Navarrete R, Almaguer-Flores A. Influence of the periodontal status on the initial-biofilm formation on titanium surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016;18:174-81.
18. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res.* 1991;2:81-90.
19. Covani U, Marconcini S, Crespi R, Barone A. Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces. *Implant Dent.* 2006;15:298-304.
20. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW et al. Supra- and subgingival biofilm formation on

- implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008;23:327-34.
21. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Stiesch M. Comparative analysis of biofilm formation on dental implant abutments with respect to supra- and subgingival areas: polytetrafluoroethylene versus titanium. *Int J Prosthodont.* 2011;24:373-5.
 22. Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gøtzsche PC, Devereaux PJ et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *Int J Surg.* 2012;10:28-55.
 23. Cortés-Acha B, Figueiredo R, Seminago R, Roig FJ, Llorens C, Valmaseda-Castellón E. Microbiota Analysis of Biofilms on Experimental Abutments Mimicking Dental Implants: An in Vivo Model. *J Periodontol.* 2017;88:1090-104.
 24. Zitzmann NU, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J. Experimental peri-implant mucositis in man. *J Clin Periodontol.* 2001;28:517-23.
 25. Heitz-Mayfield LJA. Peri-implant diseases: Diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol.* 2008;35:292-304.
 26. Mombelli A, Décaillet F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol.* 2011;38:203-13.
 27. Rimondini L, Fare S, Brambilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F et al. The effect of surface roughness on early In Vivo plaque colonization on titanium. *J Periodontol.* 1997;68:556-62.
 28. Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Bürgers R. Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21:866-72.
 29. Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodontol Res.* 1989;24:96-105.
 30. Tomasi C, Tessarolo F, Caola I, Piccoli F, Wennström JL, Nollo G et al. Early healing of peri-implant mucosa in man. *J Clin Periodontol.* 2016;43:816-24.

Figures legends:

Figure 1: The experimental abutment. Clinical view in two patients.

Figure 2.1: (A) Unused abutment, magnification 18 X, (B) Abutment after study period, magnification 18 X, (C) Biofilm formed in the concavity of the thread, magnification 1.00K X, (E) Epithelial cell attached to the biofilm, magnification 1.41K X, (D) biofilm underneath an epithelial cell 5.06K X.

Figure 2.2: Coverage and vitality by location (supragingival and subgingival). % of coverage is the percentage of the total surface area occupied by bacteria on the ten abutments, Vitality is the percentage of live cells (blue) and dead cells (light blue) in the total biomass.

Figure 3: 3D reconstructions of stack images captured by CLSM, created using Imaris software. (a-c) Three images of the supragingival area of 3 abutments. Biofilms, mostly colonized by living bacteria (marked in green), cover the majority of the surface. (d-f) Three subgingival zones. Biofilms seem to be less extensive and dead bacteria (marked in red) appear to constitute most of the biofil

Figure 1



Figure 2.1

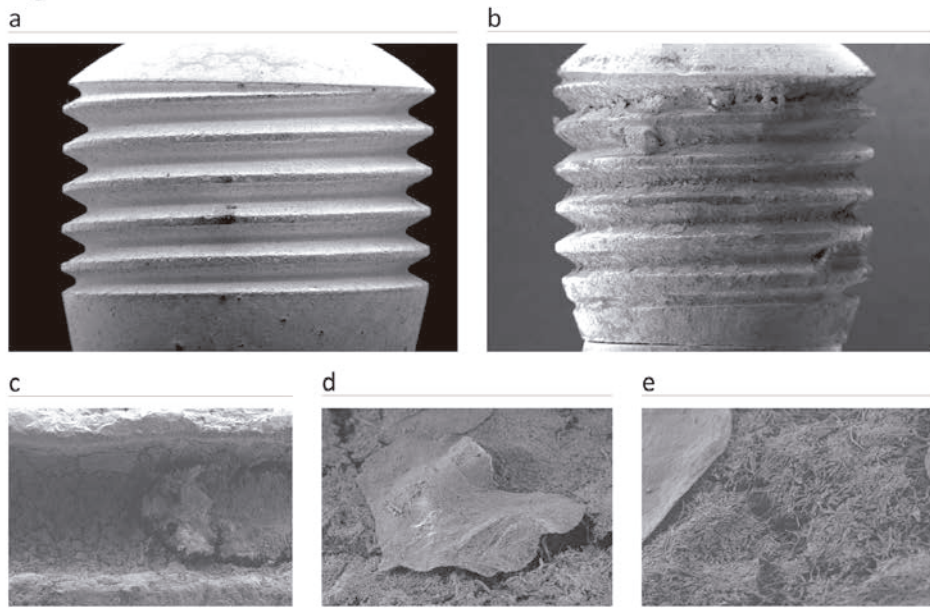


Figure 2.2

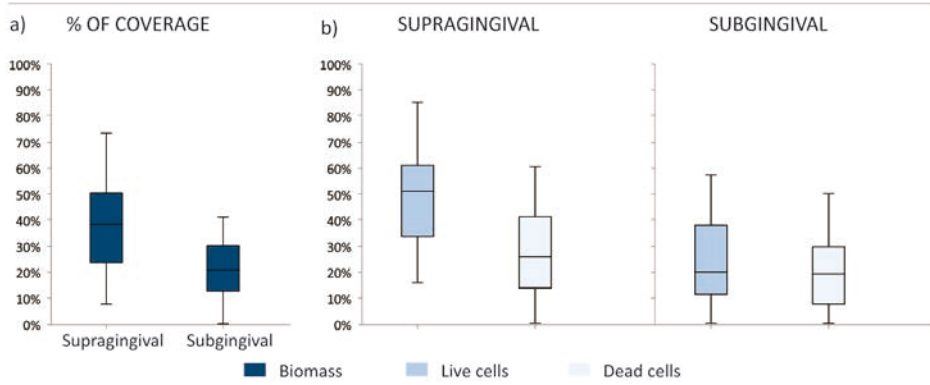
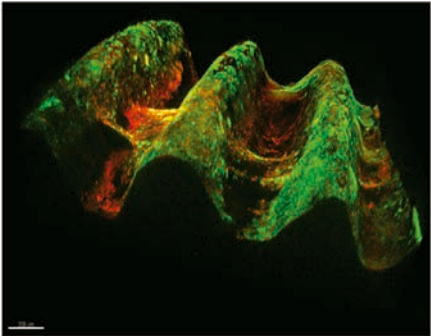
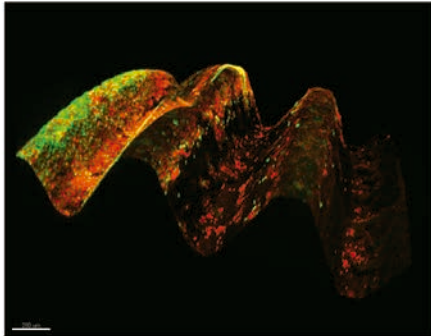


Figure 3

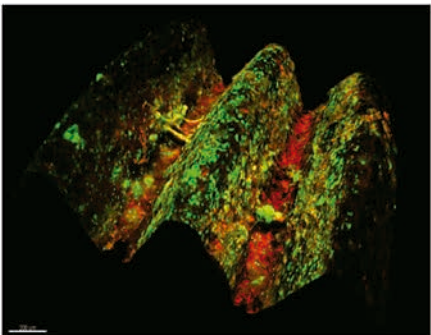
a



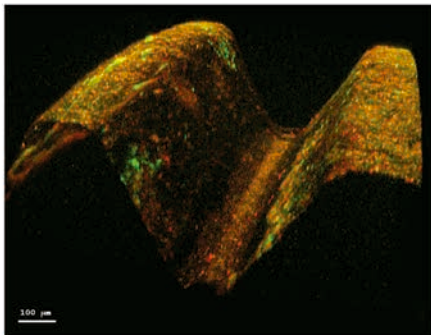
d



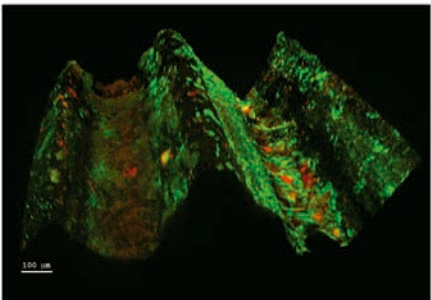
b



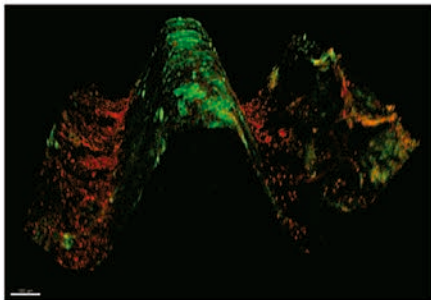
e



c



f



VIII DISCUSIÓN

ETIOLOGÍA DE LA PERIIMPLANTITIS

La información obtenida de la literatura y de la experiencia clínica con los implantes dentales y sus complicaciones parecen no coincidir siempre. Es por ello por lo que el término PI es controvertido y anima a la discusión. Una de las discusiones actuales es si la PI se debería considerar una enfermedad infecciosa o si la pérdida ósea marginal alrededor de un implante es una consecuencia o una complicación del hecho de tener un cuerpo extraño en la cavidad bucal.

Según Albrektsson y colaboradores, actualmente no existen datos en la literatura de que la “enfermedad de periimplantitis” exista como una única entidad con una etiología y patogenia específicas (188). Según esta teoría, tras la colocación de un implante se pueden dar las siguientes situaciones: que se produzca una respuesta a cuerpo extraño en la que el implante sea encapsulado, “aislado”, del resto del cuerpo y englobado en tejido óseo cada vez más condensado, todo esto unido a una inflamación crónica (osteointegración), o bien, que la respuesta a cuerpo extraño resulte en una encapsulación del implante en tejido blando (fracaso temprano del implante). En el caso de la osteointegración, a lo largo de la vida de un implante, se pueden dar dos situaciones: una es la llamada “foreign body equilibrium”, en la que se produce una estabilidad ósea pero siempre acompañada de una leve inflamación crónica y la otra, conocida como “early or late disbalance”, cuando hay un desequilibrio en el que la reabsorción ósea supera a la formación. En esta situación se da una pérdida de hueso marginal, además de micromovimientos y un aumento de la respuesta inflamatoria (189). Los presuntos factores de riesgo de este “early disbalance” son un diseño inadecuado del implante, una cirugía traumática, la poca experiencia del cirujano, un lecho receptor del implante comprometido o pacientes con problemas de salud. Por otro lado, el “late disbalance” estaría relacionado con una nueva enfermedad sistémica, restos de cemento de las prótesis, cambios en las cargas oclusales, u otros factores. De acuerdo con la teoría de Albrektsson y colaboradores (189), la infección es una respuesta tardía a la situación de desequilibrio (disbalance) y no puede ser comparada con la infección descrita en los dientes con periodontitis. Estos autores se preguntan incluso si la infección tiene alguna implicación real en el fracaso del implante.

Por otro lado, numerosos autores y publicaciones defienden que la PI es una enfermedad infecciosa mediada por bacterias. Se trataría de una situación de desequilibrio entre la carga bacteriana y la susceptibilidad o capacidad de defensa del huésped (29,42). El último Workshop Europeo de Periodoncia apunta que la mayoría de las enfermedades periimplantarias, así como las periodontales, se inician gracias a la acumulación de biofilm sobre la superficie de implantes y/o dientes (190).

Ya en el primer Workshop Europeo de Periodoncia se apuntó que el término PI se debe usar en el caso de un proceso inflamatorio destructivo alrededor de implantes oseointegrados y en función, que resulta en la formación de bolsas periimplantarias y la pérdida del hueso de soporte (31). Cabe destacar que esta definición sólo incluye aquellos implantes que hubieran tenido una cicatrización sin complicaciones, por lo que un remodelado óseo se debe diferenciar de la pérdida ósea consecuencia de una infección. En esta misma línea, Mombelli y colaboradores (55) señalan que, a pesar de que la PI es una enfermedad infecciosa en la que el rol del biofilm bacteriano queda demostrado, existe la posibilidad de que la colonización bacteriana se de como consecuencia de eventos cuyo inicio nada tiene que ver con la microbiota (27). Es, por ejemplo, el caso de un exceso de cemento que pueda ser colonizado, una mala posición del implante (implantes muy juntos o sin un mínimo de hueso que los rodee) que propicie un mayor remodelado óseo, una recesión de la mucosa y en consecuencia la exposición de la superficie del implante, que puede ser colonizada por microorganismos.

La opinión de unos y otros autores anima a la discusión. Sin embargo, como Mombelli y Décaillet (55) concluyeron, puede que los microorganismos no sean, en todos los casos, la causa inicial de la PI, pero sí que siempre están presentes en su progresión. Desde una perspectiva clínica, hay situaciones difíciles de explicar si consideramos que la PI tiene una etiología exclusivamente bacteriana. Un ejemplo concreto son los casos de los pacientes con varios implantes contiguos cuando solamente uno de ellos se ve afectado por pérdida ósea, como muestra la figura 41. Teniendo en cuenta que una infección se puede propagar fácilmente a los tejidos adyacentes, resulta difícil comprender estos casos. De todas formas, la microbiota parece claramente tener un papel en la progresión de las enfermedades periimplantarias.

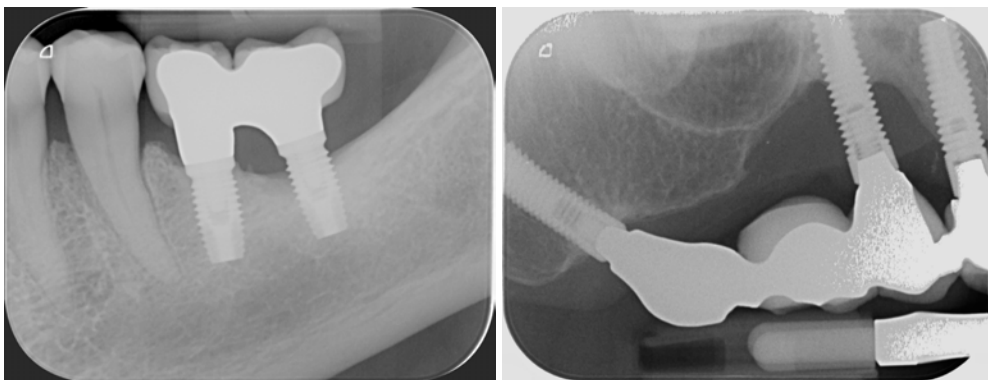


Figura 41. Radiografía periapical del 2019 que muestra dos implantes colocados en el año 2008, uno presenta pérdida ósea y el otro no.

BIOFILMS

Las bacterias se pueden encontrar en dos estados: en estado planctónico o formando biofilms. El biofilm se define como una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido (191). Las bacterias se encuentran unidas a un sustrato o una superficie, además de unidas entre sí y embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas (figura 42). Este biofilm está compuesto por múltiples microcolonias, que pueden estar formadas por bacterias de una única o de múltiples especies (192). Las microcolonias se encuentran unidas por una especie de canales de agua gracias (figura 43) a los cuales se distribuyen nutrientes y se eliminan desechos. Están compuestas, aproximadamente, en un 20% por bacterias, y el 80% restante es matriz o glicocálix. La matriz está compuesta principalmente por exopolisacáridos producidos por las propias bacterias.

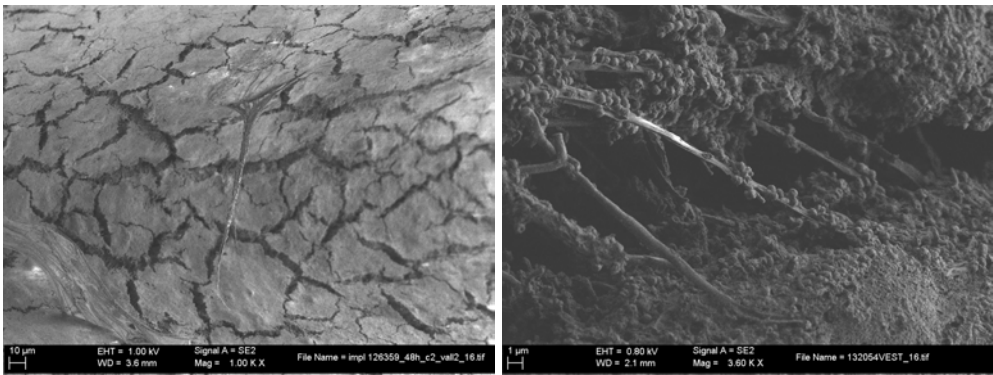


Figura 42. En éstas imágenes se observan estructuras compatibles con los restos cuarteados de parte de ese glicocalix reducido, producto del proceso de deshidratación que se lleva a cabo para el análisis de la muestra con microscopía electrónica de barrido (SEM).

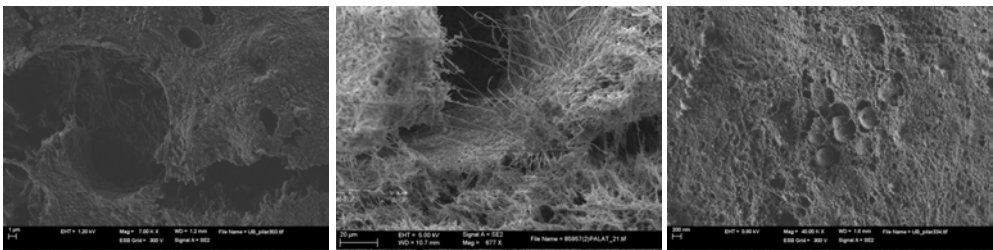


Figura 43. En esta imagen se observa el hueco dejado por los canales de agua previamente mencionados ahora ausentes por la deshidratación.

Un biofilm puede desarrollarse a partir de una célula planctónica o a partir de otro biofilm (192). Ciertas bacterias tienen la capacidad de adherirse a las superficies y, por otro

lado, ciertos factores físicos y químicos de una superficie propician una mayor adhesión a ella. En un medio rico en nutrientes, las bacterias se adhieren a cualquier superficie, mientras que en un medio pobre tienden a adherirse a una superficie nutritiva. Una vez las bacterias están unidas a la superficie sufren una serie de modificaciones. Expresan ciertos genes que pueden ayudar a estabilizar el biofilm y se inhiben otros que pueden producir un desequilibrio. De esta manera, la bacteria que crece en un biofilm manifiesta un fenotipo diferente del que manifiesta cuando crece de manera planctónica (193). Los fenotipos de las bacterias que crecen en los biofilms son más resistentes frente a diversos antimicrobianos y presentan un metabolismo más eficiente, capaz de degradar moléculas complejas. Así, cuando las bacterias crecen en biofilm (figura 44), muestran un mayor potencial patogénico en comparación con su vida planctónica (194).

Cuando se adhieren los colonizadores primarios, si las condiciones son propicias, se produce la multiplicación de éstos y la formación de microcolonias. Posteriormente se co-agregan los colonizadores secundarios o tardíos. Esta co-agregación es el proceso por el cual bacterias genéticamente distintas son capaces de unirse unas a otras a través de moléculas específicas. Esta adhesión se da entre una molécula adhesina de una bacteria (frecuentemente situada en fimbrias de la superficie) y una molécula receptora de otra (195). En un biofilm las bacterias no se distribuyen de manera aleatoria, sino que lo hacen de acuerdo con su capacidad de supervivencia y según las relaciones simbióticas que puedan producir (196).

Las bacterias del biofilm tienen la capacidad de comunicarse entre ellas por un sistema conocido como “Quorum Sensing”, que se basa en señales químicas (193). Esta comunicación influye en la estructura del propio biofilm, la producción de factores de virulencia y la resistencia bacteriana frente a antimicrobianos.

Esta tolerancia frente a antimicrobianos puede deberse a que (191–193):

- La matriz de exopolisacáridos protege las bacterias.
- Las bacterias son capaces de desarrollar resistencias cuando son atacadas con dosis subletales de antimicrobianos y, además, cuando crecen en forma sésil (en biofilms) activan genes que les proporcionan mayor resistencia.
- Gracias a la matriz, el antimicrobiano llega en menor concentración a las partes más profundas y, por otra parte, las bacterias de dichas zonas, al tener un menor aporte de nutrientes, están en forma quiescente, por lo que no son susceptibles a los antimicrobianos.
- Algunas bacterias tienen la capacidad de sintetizar enzimas que inactivan

antimicrobianos dirigidos contra bacterias de otra especie (resistencia indirecta).

- Cuanto mayor sea el tiempo de evolución del biofilm, mayor estabilidad y resistencia posee.

Por otro lado, las bacterias del biofilm tienen la capacidad de comunicarse con células del tejido circundante; por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis* pueden inducir la adhesión asociada a integrinas y la aparición de cambios en el citoesqueleto en las células epiteliales del surco gingival (197).

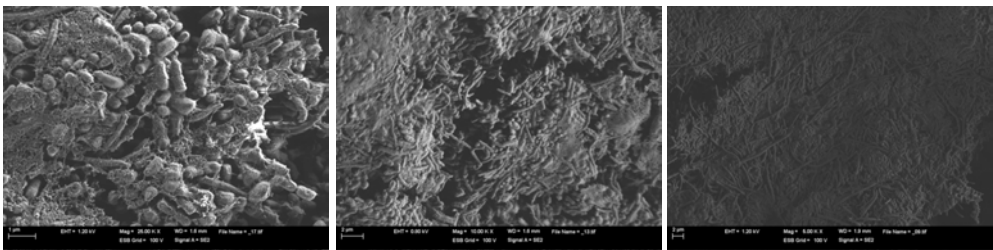


Figura 44. En éstas imágenes se observa esa interacción entre bacterias de diferente especie, lo unidas que parecen unas a otras.

1. Patogenia y biofilms

Las bacterias planctónicas producen patologías agudas, mientras que los biofilms producen patologías crónicas que pueden tener periodos de agudización. Dichos periodos de agudización podrían estar relacionados con el desprendimiento de trozos del biofilm o incluso de algunas bacterias que lo componen.

En una situación no patológica existe un equilibrio entre el biofilm y los mecanismos de defensa del huésped. Es el caso de un biofilm oral común sobre la superficie dental o sobre una superficie de implante o la prótesis que soporta. Ahora bien, cuando este equilibrio se rompe, debido a un aumento cuantitativo del biofilm (es decir, un mayor acúmulo de placa), a una disminución en las defensas del organismo (es decir, menor capacidad defensiva de los tejidos periimplantarios), o a un cambio cualitativo del biofilm, la patología puede comenzar a desarrollarse.

Los mecanismos por los que los biofilms pueden producir diversos tipos de patologías son (191):

- Liberación de bacterias o agregados de bacterias.
- Producción de endotoxinas. Las bacterias Gram negativas pueden liberar endotoxinas,

que desencadenan una respuesta inmune. Si esta respuesta inmune no elimina estas bacterias, las diversas sustancias liberadas en el proceso pueden dañar los tejidos del huésped. Por ejemplo, la producción de elastasas y celulasas por parte de las bacterias hace que su concentración aumente en la matriz y produzca daños tisulares.

- Resistencia frente al sistema inmune del huésped. Las bacterias del biofilm parecen presentar una mayor resistencia no solo a anticuerpos sino también a los leucocitos y macrófagos.
- Creación de un nicho para la generación de organismos resistentes. Los antibióticos son capaces de revertir los síntomas causados por las bacterias en estado planctónico, desprendidas del biofilm, pero no son capaces de eliminar el biofilm.

2. Implantes dentales y biofilms

En la literatura se pueden encontrar muchos artículos que estudian la formación del biofilm sobre la superficie de implantes dentales o superficies de titanio *in vitro* (138,198–201) y también *in vivo* (13,14,204–211,15,16,18,158,159,167,202,203). Algunos de estos estudian el biofilm formado entre 12 y 48h (14,15,167,202,205,206,208,211,212) y otros estudian la formación de un biofilm más maduro, formado a lo largo de 14 días (13,16,18,159,204).

Existen datos contradictorios con relación a la influencia que tienen las características de la superficie de titanio (rugosidad, SFE, alteraciones químicas) en la formación del biofilm (141,170,205,209). Aunque algunos autores relacionan el aumento de la rugosidad con una mayor colonización (141,205) otros estudios defienden que ni la rugosidad (209) ni la hidrofilia (170) son factores que influyen en la formación del biofilm.

El grupo de Zaugg y colaboradores (211), publicó en el 2016 un estudio *in vivo* con placas de titanio de diferentes superficies, en las que tanto la rugosidad como la hidrofilia eran factores que favorecían una mayor formación de biofilm. Las superficies hidrofóbicas eran las que menos biomasa acumulaban. Además, observaron que la topografía de la superficie era el factor más influyente a la hora de limpiar dicha superficie. Las superficies mecanizadas sin surcos fueron más fáciles de limpiar; sin embargo, la recolonización y re-proliferación del biofilm se daba a la misma velocidad independientemente del tipo de limpieza realizado.

Socransky y Haffajee (192), en su revisión sobre el tema, argumentaron que la rugosidad, además de aumentar la superficie de colonización, proporciona protección frente a las

fuerzas de cizallamiento, lo que favorecería una rápida formación y crecimiento del biofilm. La composición química de la superficie también influye en la colonización, puesto que puede tener características beneficiosas o perjudiciales para los microorganismos.

En la presente tesis doctoral se analizó el biofilm formado sobre la superficie de unos pilares que tienen espiras y una rugosidad de entre 1.4 y 1.5 μm , la misma superficie macro y microscópica que un implante dental (Mozo-Grau Implantes Dentales, Valladolid, España). En la zona supragingival se encontró un grado de recubrimiento del 38% (figura 46), mientras que en la subgingival fue del 21% (figura 47). Estos datos contrastan con los obtenidos por los equipos de Elter y colaboradores (18,204) y Heuer y colaboradores (16), que obtuvieron un porcentaje de recubrimiento supragingival del 17% y subgingival del 0.8%. En todos estos estudios, incluido el nuestro, los pilares se colocaron durante 14 días sobre implantes osteointegrados de voluntarios. La metodología de estudio es similar y por ello la disparidad de resultados parece relevante. Pensamos que las diferencias observadas pueden estar relacionadas con el tipo de pilar (“biofilm collector abutment”) utilizado en nuestra metodología (PR0251). Mientras que la rugosidad de aquellos estudios no superaba las 0.9 μm , en el nuestro fue casi 1.5 veces mayor, además de presentar espiras.

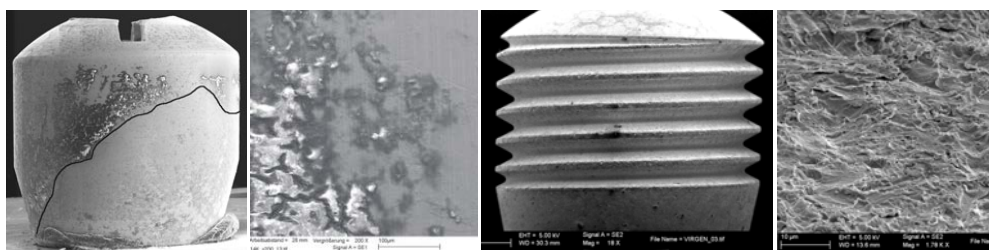


Figura 45. Pilar utilizado por Heuer y cols. (a) y pilar utilizado en nuestro estudio (b).

Este hecho puede justificar las diferencias en cuanto a la cobertura bacteriana. El estudio del biofilm sobre pilares poco rugosos no es comparable con una situación real en la que un implante se expone a la cavidad bucal, puesto que la topografía de su superficie es diferente y, por tanto, su colonización puede ser distinta también. Es importante destacar que las superficies de los implantes se han desarrollado para permitir una oseointegración más rápida y predecible. Para ello, se han tratado las superficies con distintas tecnologías para facilitar la adhesión celular. Sin embargo, estas mismas características pueden ser utilizadas por las bacterias y, es importante resaltar, que los microorganismos tienen una tasa de replicación y adaptación muy superior a las células que componen los tejidos blandos y duros de la cavidad bucal.

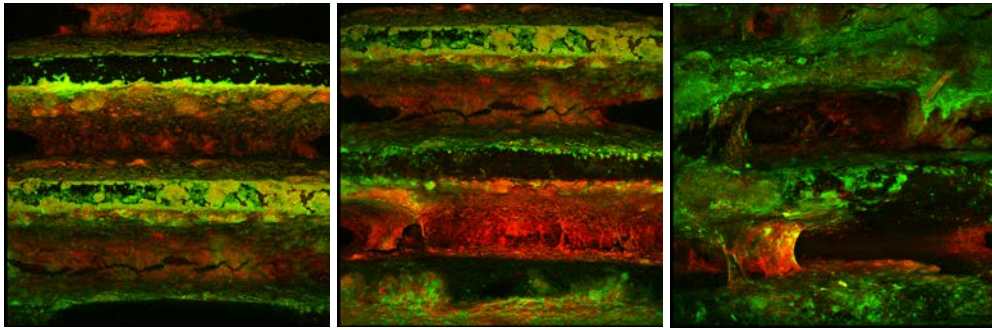


Figura 46. Imágenes obtenidas con el microscopio electrónico confocal del recubrimiento a nivel supragingival.

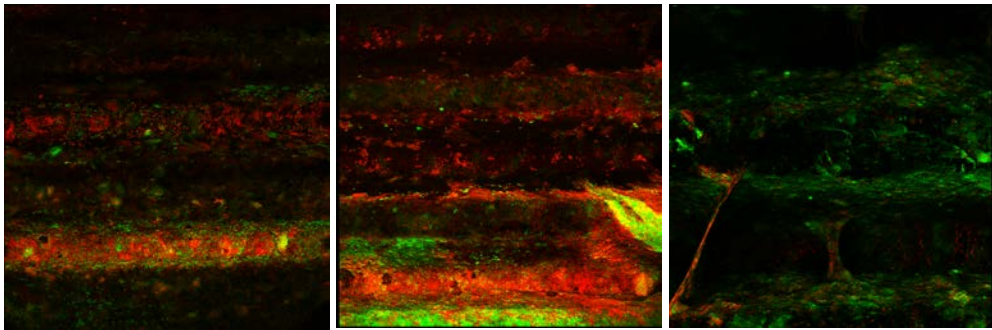


Figura 47. Imágenes obtenidas con microscopía confocal del recubrimiento a nivel subgingival.

Una vez cicatrizados los tejidos blandos alrededor de los implantes y sus prótesis, se forma una mucosa periimplantaria adherida a la parte transepitelial. Esta mucosa está compuesta por unos 2 mm de epitelio y 1-1.5 mm de tejido conectivo, según se ha demostrado previamente en estudios en animales (213) y en humanos (214).

Cuando la superficie sobre la que se adhiere esta mucosa es biocompatible y lisa, el tejido blando actúa como una barrera física que aísla en mayor o menor medida la porción submucosa del exterior. Así, Tomasi y colaboradores (215), 2 semanas tras su colocación, encontraron en la porción submucosa de sus pilares un 1% (de -0.3 a 5.1%) de la superficie cubierta por biofilm y alrededor de un 15% de su superficie estaba cubierta por restos de tejido blando, como células epiteliales o fibras del tejido conectivo. Algunos de los estudios mencionados previamente (16)(18,204) también encontraron una cobertura inferior al 1% en la zona submucosa. Sin embargo, en nuestro estudio, a pesar de encontrar también numerosas células epiteliales adheridas (figura 48), se halló más del 20% de la superficie subgingival colonizada. Esto muestra que, tal y como plantean Socransky y otros autores (192), la rugosidad y topografía de la superficie son un factor que influye en la formación del biofilm, así como en la cicatrización de la mucosa periimplantaria, que no parece ser una barrera física.

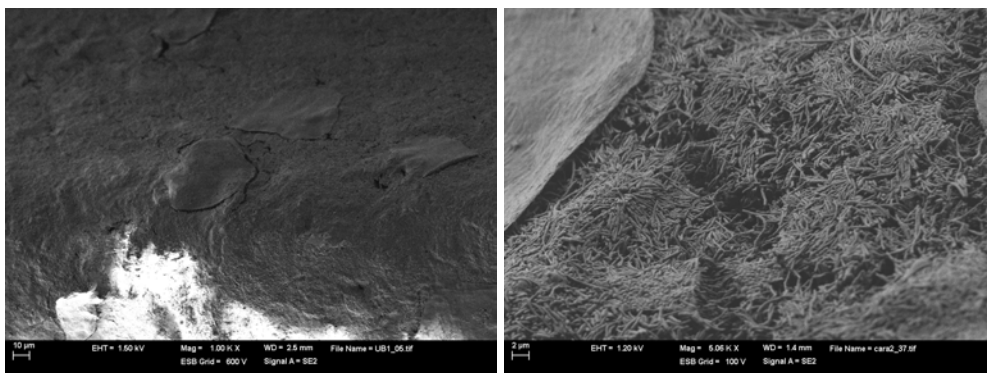


Figura 48. Células epiteliales halladas sobre el biofilm captadas con el SEM

Esta información tiene una gran aplicabilidad clínica, puesto que podemos deducir que, en el caso de una exposición de la superficie del implante, como consecuencia de un remodelado óseo o de cualquier otra causa, la mucosa periimplantaria no supone una barrera efectiva frente a la placa bacteriana y, por tanto, una parte significativa de la superficie submucosa del implante es colonizada por bacterias que podrían acelerar el proceso de pérdida ósea. La relación entre el biofilm y la profundidad del surco periimplantario debería también estudiarse, puesto que es razonable pensar que en bolsas periimplantarias profundas la composición del biofilm sea distinta del observado en zonas más superficiales, como es el caso en el presente estudio.

El presente estudio no encontró diferencias significativas en la colonización entre las caras vestibular y lingual o palatina de los pilares. Tampoco se encontraron diferencias si los pilares procedían de implantes colocados en la arcada superior o inferior. Esto puede deberse a que de entre los pilares estudiados, 11 procedían de arcadas inferiores y solo 4 de arcadas superiores. El tamaño muestral en este caso no permite analizar si existen diferencias. Tampoco se han encontrado en la literatura estudios que analicen si existe diferencia entre un implante en la arcada inferior que puede beneficiarse de autoclisis por parte de la lengua y uno de la arcada superior. O si, por el contrario, los implantes de la arcada inferior, como consecuencia del estancamiento salival pueden favorecer el desarrollo del biofilm.

La vitalidad del biofilm formado es también un elemento importante. Es un dato que no ha sido analizado en otras publicaciones, y que merece ser estudiado en profundidad en el futuro. En el presente estudio, en la zona supragingival el número de bacterias vivas (figura 46) fue estadísticamente mayor que el de bacterias muertas ($p=0.005$), mientras que, en la zona subgingival, donde predominaban las células muertas (figura 47), dichas diferencias no eran significativas ($p=0.203$). La ratio vivas/muertas fue de 1.97 en la zona supragingival y de 1.41 en el área subgingival. Esto puede deberse a

que en la zona submucosa el aporte de nutrientes y la cantidad de oxígeno presente es menor. No obstante, hay que interpretar estos datos con precaución, puesto que no se han encontrado otros estudios con los que compararlos.

Wood y colaboradores (207) fueron los primeros en idear un dispositivo que les permitiera recolectar biofilm bacteriano *in vivo* para luego poder analizarlo *ex vivo* mediante microscopía electrónica. A diferencia de nuestros hallazgos, ellos observaron unas estructuras más abiertas con numerosos canales de agua, un biofilm aparentemente menos denso, probablemente debido a que el tiempo de crecimiento fue solo de 4 días. Por otra parte, los propios autores afirmaban que es probable que se formen biofilms más densos en zonas más rugosas y con un mayor aporte de nutrientes.

La presente tesis doctoral analiza los biofilms orales formados *in situ* mediante microscopía confocal, lo cual permite observar el biofilm en su estado natural (207). Posteriormente, tras fijar dicho biofilm, lo que conlleva una deshidratación, se observó con microscopía electrónica de barrido, cuya resolución es mayor. Este segundo análisis permitió observar la morfología de superficie de la biomasa obtenida con mayor detalle (figura 49). Tal como apuntaban otros autores, tras 14 días se consiguió un biofilm heterogéneo donde no solo se pudieron observar diferentes morfologías de bacterias sino también otros componentes, como células epiteliales, partículas de apariencia cristalina o incluso fibras .

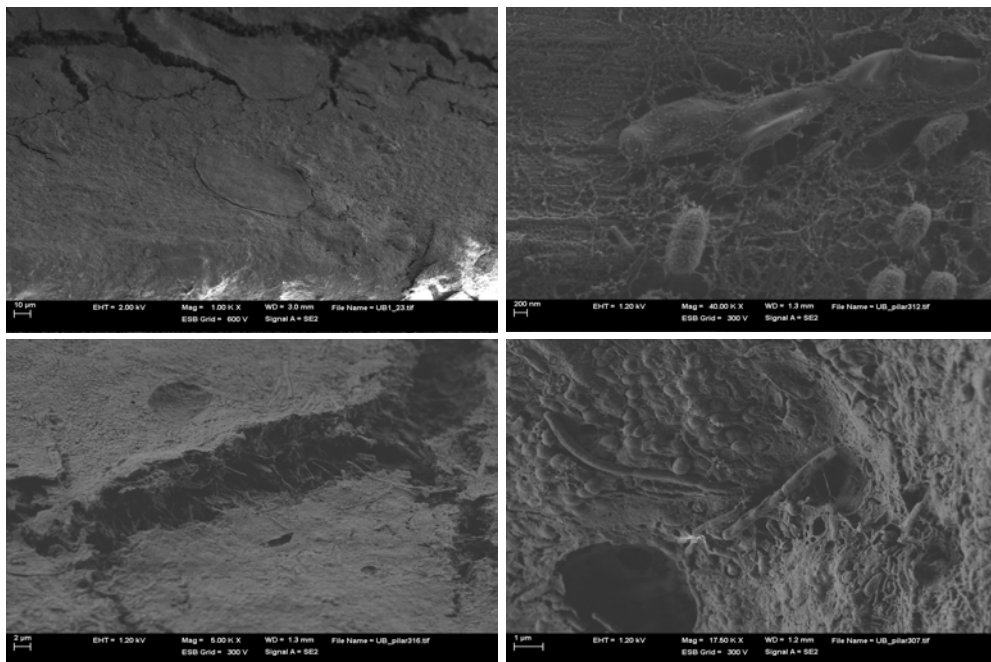


Figura 49. Imágenes que ofrece el SEM del biofilm en detalle.

3. Composición de la microbiota periimplantaria

Inmediatamente después de la exposición de la superficie de titanio al medio oral se forma sobre ella una primera capa compuesta por biopolímeros salivares, la película adquirida o “conditioning film”. Esta película es la interfase entre la superficie y los primeros microorganismos, que se unen a ella dentro de las 4 primeras horas (216). Esta película adquirida modifica las propiedades biológicas y químicas de la superficie y su composición influye directamente en la colonización bacteriana posterior.

Inicialmente, solo algunas bacterias pueden unirse a este “conditioning film”, primero de manera reversible y posteriormente de manera irreversible, pero son precisamente estas bacterias las que generan los nuevos epítomos de unión para los siguientes colonizadores; son los colonizadores primarios: *Streptococcus* (*S. mitis*, *S. oralis*) y también bacterias del género *Actinomyces*. Una vez adheridos, estos colonizadores primarios comienzan a multiplicarse y a crecer formando las distintas microcolonias. Diferentes bacterias se añaden a las existentes y el biofilm crece y madura. Una de las bacterias más importantes en el desarrollo del biofilm es el *Fusobacterium nucleatum*, que es capaz de adherirse a casi cualquier otra bacteria y es un importante mediador entre colonizadores primarios y tardíos.

Según Marsh (217), la microbiota oral puede incluir virus, micoplasma, bacterias, arqueas, hongos y protozoos, y las propiedades del lugar de formación del biofilm influyen directamente en el tipo de microorganismos que lo componen, así como en su actividad. Por ejemplo, el biofilm del surco crevicular (sobre la superficie de dientes) tiene una microbiota diversa que incluye bacterias Gram positivas y Gram negativas y muchos anaerobios estrictos, entre ellos *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Treponemas*.

Como Teughels y colaboradores (129) indican, en la formación y composición del biofilm influyen las características del sustrato donde se forma, pero también las características del ambiente en el que está este sustrato. Por ejemplo, el pilar, en su porción subgingival, tiene un ambiente más anaerobio, nutrientes endógenos derivados principalmente del fluido crevicular y un pH neutro o alcalino (217). Por ello, es posible que estas mismas bacterias se encuentren colonizando la superficie de los implantes expuestos, por lo menos a nivel subgingival.

Zhuang y colaboradores (230) estudiaron, mediante técnica de PCR y toma de muestras con puntas de papel en el surco, la prevalencia de 6 bacterias diferentes en dientes e implantes, enfermos y sanos. Observaron diferencias evidentes en la composición de la microbiota subgingival entre dientes e implantes asociados al estado de salud; sin

embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Cabe destacar que en este estudio todos los pacientes tenían antecedentes de enfermedad periodontal y que, en mayor o menor proporción, todos los implantes sanos presentaron las 6 bacterias analizadas: *P. gingivalis*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* y *S. aureus*. Esta última, según otros estudios, parece exhibir una específica afinidad con el titanio (116,218).

Eick y colaboradores, en 2016, utilizaron la técnica PCR para analizar y comparar la microbiota en dientes e implantes (162). Los test utilizados permitían analizar la presencia de 11 patógenos. De todas las especies observadas, solo 3 no se encontraron en los implantes; *Staphylococcus simulans*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*. Del resto, todas tuvieron presencia en mayor o menor medida. Las bacterias analizadas eran patógenos periodontales, y muchas de ellas, al menos en el plano teórico, deberían estar presentes en zonas enfermas, aunque varios de los estudios las han detectado alrededor de implantes sanos. Por ello, se han comenzado a postular ideas sobre bacterias con “afinidad” a las superficies de titanio. Se argumenta que el surco periimplantario es más profundo que el periodontal y, por tanto, con condiciones más anaerobias (162). Incluso la contaminación de la interfase implante-prótesis, al estar en un ambiente protegido y anaerobio (219), puede propiciar la presencia de estas bacterias, independientemente del estado de salud o enfermedad. Si bien es cierto que ciertas bacterias poseen factores de virulencia y/o son capaces de producir daños en los tejidos blandos, puede que esta colonización bacteriana no sea causante de la enfermedad. Dicho de otro modo, un implante puede ser considerado sano aún teniendo patógenos periodontales en su superficie. No obstante, su presencia puede propiciar una mayor destrucción del tejido periimplantario y una rápida progresión de la pérdida ósea.

Heitz-Mayfield y colaboradores (116), en su revisión de la literatura, encontraron que la microbiota alrededor de los implantes sanos está compuesta en su mayor parte por cocos y bacilos Gram positivos aerobios facultativos, aunque a veces se pueden encontrar bacilos anaerobios Gram negativos en bajas proporciones. Por otro lado, los implantes que muestran signos de PI se asocian a microorganismos anaerobios Gram negativos en su mayor parte, con una gran proporción de periodontopatógenos de los “clusters” rojo (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) y naranja (*Fusobacterium sp.*, *P. intermedia*) así como de *A. actinomycetemcomitans*, *S. aureus* y *C. albicans*. Sin embargo, en nuestro estudio, cuyas muestras proceden de implantes sanos, se encontraron en grandes proporciones *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *Fusobacterias*. De Boever y De Boever (220) examinaron de manera prospectiva la abundancia de 5 bacterias *A. Actinomycetemcomitans*, *T. Denticola*, *P. Gingivalis*, *T. Forsythia* y *P. intermedia* en 22 pacientes que habían sido tratados previamente con éxito de

periodontitis agresiva severa y que llevaban implantes. Estas bacterias se identificaron al inicio del estudio y también en las muestras tomadas alrededor de los implantes (a los 14 días y 6 meses). Sin embargo, a pesar de la presencia de estos patógenos, todos los implantes se describen como sanos, sin inflamación de la mucosa ni pérdidas óseas.

Por otro lado, Robitaille y colaboradores (221) refieren que la microbiota que se encuentra alrededor de los implantes sanos está compuesta predominantemente por los siguientes géneros: *Butyvirbio*, *Campylobacter*, *Eubacterium*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Leptotrichia*, *Propionibacterium*, *Peptococcus*, *Lactococcus* y *Treponema*.

Finalmente, si analizamos la última revisión sistemática publicada sobre el perfil microbiano de los implantes dentales con PI observamos lo siguiente (222): de los 21 estudios analizados, en 8 de ellos hubo mayor frecuencia de bacterias del clúster rojo (38%) y en 9 (42.8%) del clúster naranja, en implantes con PI. Sin embargo, en un tercio de los estudios no se encontraron diferencias en la microbiota de implantes sanos o enfermos.

Si nos centramos sólo en los implantes sanos, los diferentes estudios muestran que éstos pueden ser colonizados por *P. gingivalis* (0-79% de los estudios), *T. forsythia* (0-80%), *P. intermedia* (6.6-23%), *S. aureus* (0-19.1%) y bacilos Gram negativos (6-13%). Lafauri y colaboradores (222) apuntan que la presencia de periodontitis puede influir en la colonización bacteriana de los implantes sanos y que, por tanto, los dientes actúan como reservorio. Así explican el hallazgo de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* en implantes sanos. Sin embargo, esto no concuerda con nuestros resultados, puesto que encontramos *P. gingivalis* únicamente en pilares de pacientes si antecedentes de periodontitis, y *T. forsythia* en ambos tipos de pacientes, aunque más abundante en pacientes con antecedentes de periodontitis.

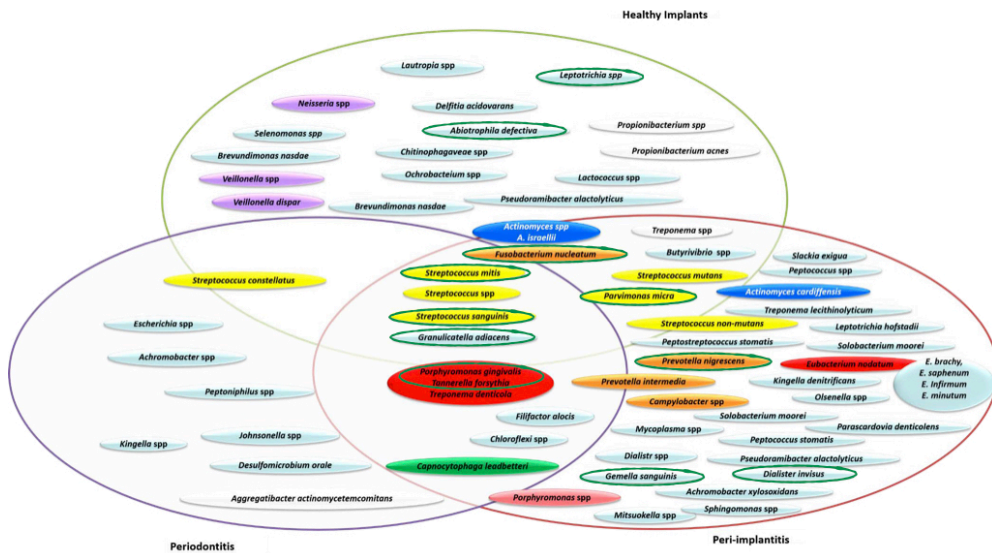


Figura 50. Gráfica obtenida del artículo de Lafaurie y colaboradores 2017 (222) y sobresaltadas en verdes las bacterias encontradas en nuestro estudio.

Según los resultados de nuestro estudio, las bacterias más abundantes según el perfil del paciente se presentan en la tabla 11:

Bacterias	GS		GP		Ambos	Totales
	Recuento	%	Recuento	%		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	24.714	18%	15.404	9.8%	✓	40.118
<i>Prevotella oris</i>	8.222	6.22%	12.264	7.87%	✓	20.486
<i>Prevotella melaninogenica</i>	10.583	8.91%	8.895	5.71%	✓	19.478
<i>Rothia dentocariosa</i>	8.684	6.5%	4.491	2.8%	✓	13.175
<i>Prevotella denticola</i>	862	0.65%	11.352	7.29%	✓	12.214
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	6.440	4.8%	5.591	3.5%	✓	12.031
<i>Veillonella parvula</i>	7.698	5.8%	4.118	2.6%	✓	11.816
<i>Porphyromonas endodontalis</i>			7.183	4.6%	✗	7.183
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	4.629	3.5%			✗	4.629
<i>Prevotella baroniae</i>			4.502	2.8%	✗	4.502
<i>Porphyromonas spp</i>			3.949	2.5%	✗	3.949
<i>Prevotella spp</i>			2.267	1.4%	✗	2.267
<i>Abiotrophia paraadiacens</i>	1.353	1%			✗	1.353
<i>Streptococcus</i>	1.069	0.8%			✗	1.069
<i>Kingella</i>	1.048	1.4%			✗	1.048

GS: específicas del grupo sin antecedentes de periodontitis
 GP: específicas del grupo con antecedentes de periodontitis
 Ambos: encontradas en ambos grupos

Tabla 11. Tabla de bacterias en orden de abundancia

Welch y colaboradores, en su estudio publicado en el 2016 sobre la biogeografía del microbioma oral del humano, se centraba en muestras de placa, tanto supra como subgingival, en dientes de voluntarios tras 12-48h sin higiene bucal (223). Observaron que la estructura del biofilm obtenido tenía forma de “erizo” y seguía un patrón similar en todas las muestras. La bacteria principal y más abundante fue el *Corynebacterium matruchotii* (abundancia del 3% en 90% de los individuos), y es la que formaba la estructura principal del erizo. Esta bacteria parecía adherirse no a la biopelícula inicial sino a una primera capa de colonizadores primarios (*Streptococcus* y *Actinomyces*). A partir del *Corynebacterium* se añadían el resto de las bacterias específicas de la placa supra y subgingival: *Porphyromonas*, *Haemophilus/Aggregatibacter* (incluyendo

Neisseria, *Kingella* y *Eikenella*), *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Capnocytophaga* y *Actinomyces*. Así, el *Corynebacterium* parece ser una bacteria relevante ya que podría servir de puente para la adhesión del resto de bacterias y es por ello por lo que era la más abundante. Estos autores descartaban por tanto la hipótesis aceptada por otros autores de que *Fusobacterium* es la bacteria “puente” para el resto, puesto que encuentran una abundancia igual o mayor del resto de bacterias. En nuestro estudio se detectó en abundancia el *Fusobacterium nucleatum* en ambos grupos (24714; 18% en paciente sin antecedentes de periodontitis, 15404; 9.8% en pacientes con antecedentes de periodontitis) y el *Corynebacterium matruchotii* específico en GS (4629), lo que parece avalar la teoría de que *F. nucleatum* podrían tener una función de “puente”, por lo menos, en cuanto al biofilm formado sobre implantes se refiere (195,224). La función de *Corynebacterium matruchotii* (puesto que sólo se encuentra en GS) no está clara. El hecho de que el *Fusobacterium nucleatum* sea más abundante puede deberse a que, según explican los autores (223), el *Corynebacterium* es una bacteria altamente específica de la placa dental (tanto supra como subgingival) y por tanto no debe ser tan afín con la superficie de los pilares. Otros géneros específicos en la placa dental según otros autores son *Capnocytophaga*, *Lautropia* y *Rothia*, que se encontraron también en gran abundancia sobre nuestros pilares (excepto la *Lautropia*). Por otro lado, los géneros *Streptococcus* y *Veillonella* son unos colonizadores muy eficientes de cualquier superficie y prueba de ello es su abundancia en nuestro estudio. Algunos autores postulan que el género *Veillonella*, coco anaerobio Gram negativo, no es capaz de colonizar los dientes si no es en presencia un compañero metabólico.

Todos estos aspectos son extremadamente útiles para diseñar una terapia antimicrobiana adecuada en el tratamiento de la PI. Dado que es imposible realizar una descontaminación total de las superficies de los implantes, una posible terapia podría estar orientada a estos microorganismos puente, ya que, sin ellos, no es posible la adhesión de las bacterias más agresivas y resistentes. Por otro lado, estas podrían ser más sensibles a los agentes antimicrobianos disponibles en el mercado.

4. Patogenia de las enfermedades periimplantarias

La PI como enfermedad infecciosa, es un proceso que se desarrolla tras largos periodos de colonización. Investigaciones recientes remarcan la importancia de las sinergias que puedan tener las bacterias entre sí, por los factores virulentos o por la capacidad de dañar los tejidos blandos. Además, un desequilibrio entre la patogenia de estos biofilms y la capacidad de respuesta del huésped puede conllevar a una progresión rápida de la enfermedad. Otros ejemplos son *Erysipelothrix rhusiopathiae* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, muy presentes en ambos grupos de pilares y presentes en estudios previos

(9), cuya función parece ser la de equilibrar la comunidad de bacterias.

A. naeslundii que se considera un promotor de biofilm por su elevada capacidad de adhesión y sus fimbrias (225), fue encontrado en abundancia en todos nuestros pilares. Por otro lado, *P. gingivalis* se detectó únicamente en el grupo de pacientes sin antecedentes de enfermedad periodontal. La virulencia de esta bacteria consiste en su capacidad de alterar el balance inhibitorio de proteasa-proteasa y degradar la matriz extracelular. Es capaz de degradar la fibronectina y, por tanto, alterar la adhesión de fibroblastos. *T. forsythia*, también encontrada en abundancia en nuestro estudio, interfiere en la respuesta del huésped inhibiendo al sistema del complemento. Otro microorganismo relevante sería el *C. rectus*, frecuentemente encontrado en implantes con PI y que, sin embargo, se halló de forma abundante en nuestras muestras (consideradas clínicamente sanas). Su virulencia es escasamente conocida, pero se han descrito citotoxinas y proteínas capaces de estimular la respuesta inmune de los fibroblastos (162).

Todos estos resultados y el hecho de que se han detectado en abundancia varias especies bacterianas nunca descritas antes como integrantes del microbioma oral indican la gran necesidad de realizar estudios adicionales en este campo. Efectivamente, hoy en día, existen pocos datos sobre las bacterias que conforman la microbiota presente sobre los implantes dentales. Además, los resultados reportados presentan algunas contradicciones que generan más dudas.

Como se ha explicado anteriormente, cada especie bacteriana puede tener capacidad patogénica por sí misma, puede promover la adhesión de nuevas bacterias o puede crear ese desequilibrio entre la microbiota y el huésped. La importancia radica en conocer la función de cada microorganismo individualmente y cuando forma parte del biofilm. Además de esto, es imprescindible conocer la capacidad de respuesta del huésped.

Los presentes trabajos parecen estar en concordancia con lo descrito en la literatura y es que la colonización bacteriana depende de las características de la superficie a colonizar, el medio en el que se encuentra dicha superficie, y las interacciones entre bacterias y huésped. En cuanto a esto último, como se explicó en la introducción, el surco periimplantario es anatómica e histológicamente diferente al surco periodontal, tanto en situaciones de salud como en enfermedad. Las características anatómicas e inmunes de los tejidos periimplantarios parecen jugar un papel importante en la selección de la comunidad microbiana periimplantaria, que es diferente de la periodontal.

En cuanto a las características de la superficie, los implantes difieren de los dientes en su morfología, material, rugosidad y SFE. Como hemos mencionado, la colonización bacteriana está altamente influenciada por estos aspectos. De hecho, varios estudios *in vitro* han revelado que *P. gingivalis*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum* y *Lactobacillus salivarius* se adhieren significativamente mejor a una superficie rugosa de titanio (221).

La SFE es también una propiedad para tener en cuenta puesto que influye en la adhesión de los primeros colonizadores y, puesto que los colonizadores tardíos dependen de estos, la composición del biofilm maduro depende en parte de la SFE. La SFE del esmalte es de $0.088 \pm 0.001 \text{ Jm}^{-2}$ y la del titanio, $0.051 \pm 0.001 \text{ Jm}^{-2}$ (221). Así, una superficie con una baja SFE promoverá la adhesión de bacterias con baja SFE.

Gracias a estos conocimientos y al uso de nuevas técnicas microbiológicas, como la 16S-sequencing, se ha demostrado que la microbiota periodontal y la periimplantaria difieren considerablemente. La microbiota encontrada alrededor de los implantes dentales parece ser mucho menos diversa que la encontrada en dientes, y la proximidad de los dientes no parece suficiente para que las bacterias del periodonto colonicen el implante. Es más, un estudio microbiológico demostró que el 60% de los individuos compartían menos del 50% de las especies bacterianas entre sus biofilms periodontales y periimplantarios, y que el 85% de los sujetos compartían menos del 8% de especies abundantes entre dientes e implantes (11). No obstante, pueden existir patógenos asociados a la periodontitis que colonicen las superficies de implantes. Por otro lado, estos datos tampoco descartan que la periodontitis sea un factor de riesgo para la mucositis o la PI (226,227). Sin embargo, como han matizado Baas-Becking y Beijerinck (221) “todo está en todas partes, pero el ambiente selecciona”. Así, parecería que el implante y su tejido circundante crean un medioambiente específico que promueve la adaptación y selección microbiana.

Actualmente, la periodontitis se considera el resultado de una sinergia y una disbiosis polimicrobiana y es posible que en PI suceda algo parecido. Además, hay que tener en cuenta no solo qué bacterias están presentes, sino también cómo interactúan con el tejido periimplantario. Otro aspecto importante está asociado a los factores iniciadores de la enfermedad. La presencia de cuerpos extraños, restos de cemento, remodelado óseo fisiológico, el acúmulo de placa bacteriana o la yatrogénia entre otros factores, pueden dar lugar a una exposición de la superficie del implante que puede ser colonizada por bacterias. Conocer más sobre esta colonización debería ser objetivo de futuras investigaciones para comprender mejor la patogenia de la PI.

IX LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS

La principal limitación de los estudios objeto de esta tesis es el tamaño de la muestra. Los estrictos criterios de inclusión y exclusión y la necesidad de retardar la colocación de la prótesis dificultó en gran medida la captación de voluntarios. Además, la metodología del estudio I tiene un elevado coste. Este estudio se pudo realizar gracias a una beca concedida por la Facultad de Odontología de la Universitat de Barcelona, que permitió el análisis de 10 muestras. No obstante, los estudios encontrados en la literatura que analizan el biofilm formado sobre la superficie de implantes y/u otros aditamentos utilizan tamaños muestrales similares (16–18).

Una segunda cuestión a tener en cuenta y que debería ser objeto de futuras investigaciones es la descripción del proceso de formación de un biofilm maduro, es decir, su observación tras 24, 48h o incluso 7 días. Esto permitiría conocer cómo se van depositando las bacterias y saber cuando se establece un biofilm maduro, es decir si tarda 14 días como en una superficie dental (135) o es más rápido.

Relacionado con el estudio I, sería interesante repetirlo con un mayor tamaño muestral para poder establecer un perfil microbiológico, pero también sería interesante añadir no sólo implantes sanos como en nuestro estudio, sino analizar también la microbiota que coloniza estos pilares cuando son colocados sobre implantes con mucositis o PI, para identificar posibles diferencias.

Por último, una limitación a tener en cuenta del estudio I es que cualquier método de pirosecuenciación extrae y secuencia el ADN de todas las células contenidas en una muestra, pero no distingue entre células vivas y muertas. Para poder analizar y secuenciar únicamente las células vivas de la muestra, en el momento de la extracción del pilar sería necesario realizar una técnica de citometría que marcara y permitiera separar en dos fracciones las vivas de las muertas, para posteriormente secuenciar únicamente la fracción de vivas. En un primer momento no se planteó realizar esta citometría porque creemos que es interesante tener conocimiento del amplio espectro de la microbiota que coloniza la superficie de los implantes. El microbioma lo componen tanto células vivas como muertas, así como otros componentes, por lo que tiene interés conocer la composición bacteriana, independientemente de si las bacterias están aún vivas o han muerto hace horas/días. Así mismo, a pesar de que alguna célula muera, es posible que la cepa persista, aunque en mayor o menor porcentaje. En nuestro estudio se utilizó un método de triple filtrado en el que debía existir una coincidencia de identidad con la base de datos superior al 90%, una abundancia superior a 10 hits y una presencia en al menos 3 pacientes. La presencia de las bacterias descritas estaba respaldada por más de 10 secuencias parejas. Este filtrado de datos seleccionó bacterias encontradas en abundancia significativa y por tanto relevantes como parte de la microbiota que colonizaba la superficie de los implantes.

X FUTURAS
INVESTIGACIONES
Y APLICABILIDAD
CLÍNICA

Los pilares desarrollados para la presente tesis doctoral han demostrado ser efectivos para recoger y analizar el biofilm formado sobre implantes. Así, con esta misma metodología, existen varios aspectos que se podrían explorar en estudios futuros.

Uno de los más interesantes, sería analizar la microbiota en distintos momentos (por ejemplo, estudiarlo cuantitativa y cualitativamente a las 24h, 48h y 7 días). Esto permitiría analizar qué microorganismos son colonizadores primarios.

Por otro lado, esta misma metodología puede ser empleada para evaluar la eficacia de los distintos tratamientos no quirúrgicos de las enfermedades periimplantarias. Así, tras replicar un biofilm *in vivo* maduro (14 días), se podría comparar la cantidad y viabilidad del biofilm tras la aplicación de distintos métodos de descontaminación. También sería interesante analizar cómo se vuelve a formar ese biofilm (recolonización) tras dichos tratamientos, pues es probable que alguno de estos tratamientos modifique la superficie del implante.

Sin duda, una de las preguntas más relevantes para la que aún no tenemos respuesta es si existen diferencias significativas entre la microbiota presente en implantes sanos y enfermos (con mucositis o PI). Sería interesante realizar un nuevo estudio con una muestra mas amplia que permitiera estudiar qué bacterias están presentes cuando se dan estas situaciones patológicas y compararlas con las encontradas en situaciones de salud. Esto permitiría definir un perfil microbiológico asociado a la enfermedad que podría ayudar a diseñar tratamientos mas precisos que tal vez usaran ciertos antibióticos o antisépticos como coadyuvantes.

De entre los antibióticos más frecuentemente usados en Odontología se encuentran: amoxicilina, clindamicina y metronidazol. La mayoría de las bacterias encontradas en el estudio I son Gram negativas anaerobias. La amoxicilina podría ser una buena elección para combatir estas especies. Sin embargo, se encontraron en abundancia *Prevotellas*, que son productoras de betalactamasas, lo que implica la necesidad de asociar un inhibidor de betalactamasas (por ejemplo el ácido clavulánico). El metronidazol es eficaz frente a bacilos Gram negativos anaerobios y espiroquetas, pero no frente a bacterias aerobias que también se encontraron presentes en el estudio I. En alérgicos a penicilinas el antibiótico de elección es la Clindamicina. Sin embargo ésta no es efectiva frente a algunos bacilos Gram negativos como pueden ser: *A. actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* y *Capnocytophaga spp* (228), especies que se encontraron de manera significativa en el estudio I.

La bacteria más abundante según el estudio I es el *Fusobacterium nucleatum*. Esta bacteria ha mostrado la capacidad de diseminación a nivel sistémico para así colonizar diferentes zonas y partes del cuerpo (229). Así mismo provoca una serie respuestas en

el huésped como por ejemplo la estimulación de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-8 y TNF α . En una situación de salud los factores pro y antiinflamatorios se encuentran bajo una homeostasis (229). Pero en el momento que se establece una disbiosis y el *F. nucleatum*, por ejemplo, aumenta su protagonismo, se puede exacerbar la inflamación y pasar a ser un patógeno. Futuras investigaciones podrían determinar si tal vez la clave de salud periimplantaria no está en eliminar o descontaminar al 100% las superficies sino en conseguir ese estado de equilibrio en que unas bacterias regulen a otras.

Son muchas aún las preguntas que se plantean sobre el biofilm que se forma sobre la superficie de los implantes dentales y su papel en las enfermedades periimplantarias. Lo estudios de la presente tesis permiten diseñar una serie de directrices que pueden guiar la práctica clínica.

Por un lado, el estudio II muestra que un implante expuesto a la cavidad bucal tendrá un recubrimiento casi total de su superficie en al menos 2 semanas. Este recubrimiento, aunque sea especialmente evidente en la porción supragingival, también afecta a la zona subgingival. Así, es extremadamente importante que las prótesis permitan que el paciente pueda higienizar bien toda esta zona, incluido el surco periimplantario. Esta cuestión tiene también su importancia a la hora de decidir qué hacer cuando un implante se expone a la cavidad oral como consecuencia de un proceso de remodelación o como consecuencia de la progresión de la PI. Una vez dada esta situación, aún consiguiendo una descontaminación completa de la superficie y una desinflamación total de los tejidos blandos periimplantarios, la superficie del implante se recolonizará en un corto periodo de tiempo. Este dato será importante a la hora de decidir el intervalo de los mantenimientos periimplantarios en estos casos o si decidimos modificar de alguna manera la superficie del implante expuesto para dificultar esa recolonización. Los protocolos de mantenimiento y de tratamiento deben tener en cuenta estos aspectos.

De la misma manera, la gran diversidad de microorganismos encontrados en el estudio I, puede llevar a pensar que serán necesarios agentes antimicrobianos de amplio espectro y con una gran capacidad de penetración en el biofilm.

XI CONCLUSIONES

Primera

Tras 14 días de exposición a la cavidad bucal, la mayoría de la superficie de los implantes se cubrirá por un biofilm maduro y espeso compuesto por una microbiota heterogénea con predominio de *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella denticola*.

Segunda

La porción supragingival de los implantes expuestos a la cavidad bucal presenta un mayor grado de recubrimiento y espesor de biofilm, en comparación con la zona subgingival. En concreto, un 38% de su parte supragingival y un 21% de su parte subgingival se colonizó por bacterias tras 14 días de exposición a la cavidad bucal. No existen diferencias entre el recubrimiento encontrado en las caras vestibular y lingual o palatina.

Tercera

Se pueden identificar 96 especies diferentes, siendo las bacterias más abundantes *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella denticola*. Se han aislado 19 especies bacterianas que nunca antes habían sido descritas como parte del microbioma oral.

Cuarta

La cantidad y distribución del biofilm formado sobre un implante tras 14 días expuesto al medio oral no difiere entre pacientes con y sin antecedentes de periodontitis.

XII LISTADO DE LAS PRINCIPALES ABREVIACIONES

- **PI** Periimplantitis
- **DNA/ADN** Ácido desoxirribonucleico
- **HOMD** Human oral microbiome database
- **SEM** Microscopio electrónico de barrido
- **EP** Enfermedad periodontal
- **N** Newtons
- **TC** Tomografía computada
- **TCHC** Tomografía computada de haz cónico
- **BOP** Sangrado al sondaje
- **ENSO** Encuesta nacional de salud oral
- **LPO** Ligamento periodontal
- **PMN** Polimorfonucleares
- **SFE** Energía libre superficial
- **µm** micras
- **PCR** Polimerase chain reaction
- **PS** Profundidad de sondaje
- **PO** Pérdida ósea
- **GS** Grupo periodontalmente sanos
- **GP** Grupo con antecedentes de periodontitis

XIII BIBLIOGRAFÍA

1. Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(5):339–45.
2. Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E, Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol.* 1987;2(4):145–51.
3. Botero JE, González AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. *J Periodontol.* 2005;76(9):1490–5.
4. Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *J Clin Periodontol.* 2011;38(11):188–202.
5. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27(6):409-19.
6. Murray JL, Connell JL, Stacy A, Turner KH, Whiteley M. Mechanisms of synergy in polymicrobial infections. *J Microbiol.* 2014;52(3):188-99.
7. Canullo L, Schlee M, Wagner W, Covani U, Montegrotto group for the study of peri-implant disease. International brainstorming meeting on etiologic and risk factors of peri-implantitis, Montegrotto (Padua, Italy). *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015;30(5):1093–104.
8. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(10):975–82.
9. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol.* 2012;39(5):425–33.
10. Van der Horst J, Buijs MJ, Laine ML, Wismeijer D, Loos BG, Crielaard W, et al. Sterile paper points as a bacterial DNA-contamination source in microbiome profiles of clinical samples. *J Dent.* 2013;41(12):1297–301.
11. Dabdoub SM, Tsigarida AA, Kumar PS. Patient-specific analysis of periodontal and peri-implant microbiomes. *J Dent Res.* 2013;92(12):168-75.

12. Zheng H, Xu L, Wang Z, Li L, Zhang J, Zhang Q, et al. Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental implants. *Sci Rep*. 2015;16(5):10948.
13. Rasperini G, Maglione M, Cocconcelli P, Simion M. In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: a comparative microbiological and SEM analysis. *Clin Oral Implants Res*. 1998;9(6):357–64.
14. Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(2):156–64.
15. Do Nascimento C, Da Rocha Aguiar C, Pita MS, Pedrazzi V, de Albuquerque RF, Ribeiro RF. Oral biofilm formation on the titanium and zirconia substrates. *Microsc Res Tech*. 2013;76(2):126–32.
16. Heuer W, Elter C, Demling A, Neumann A, Suerbaum S, Hannig M, et al. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehabil*. 2007;34(5):377–82.
17. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW, et al. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23(2):327–34.
18. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Stiesch M. Comparative analysis of biofilm formation on dental implant abutments with respect to supra- and subgingival areas: polytetrafluoroethylene versus titanium. *Int J Prosthodont*. 2011;24(4):373–5.
19. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81–100.
20. Brånemark PI, Breine U, Adell R, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Experimental studies on intra-osseous anchorage of dental prosthesis. *Årsbok Göteborgs tandläkare-sällskap*. 1970;9–25.
21. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson A. The long-term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1986;1(1):11–25.
22. Zembic A, Kim S, Zwahlen M, Kelly JR. Systematic review of the survival rate and

incidence of biologic, technical, and esthetic complications of single implant abutments supporting fixed prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29:99–116.

23. Jung RE, Pjetursson BE, Glauser R, Zembic A, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(2):119–30.

24. Albrektsson T, Donos N; Working Group 1. Implant survival and complications. The Third EAO consensus conference 2012. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(6):63–5.

25. Heitz-Mayfield LJA, Needleman I, Salvi GE, Pjetursson BE. Consensus statements and clinical recommendations for prevention and management of biologic and technical implant complications. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29:346–50.

26. Schimmel M, Srinivasan M, Herrmann FR, Müller F. Loading protocols for implant-supported overdentures in the edentulous jaw: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29:271–86.

27. Mombelli A, Müller N, Cionca N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(6):67–76.

28. Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C. Prevalence of peri-implant diseases. A cross-sectional study based on a private practice environment. *J Clin Periodontol*. 2012;39(5):490–4.

29. Heitz-Mayfield LJA. Diagnosis and management of peri-implant diseases. *Aust Dent J*. 2008;53(1):43–8.

30. Levignac J. Periimplantation osteolysis- periimplantosis - periimplantitis. *Rev Fr Odontostomatol*. 1965;12(8):1251–60.

31. Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of session IV. In: Lang NP, Karring T (eds). *Proceedings of the first European Workshop on Periodontology*. London: Quintessence; 1994. p. 365–9.

32. Renvert S, Persson GR, Pihl FQ, Camargo PM. Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations. *J Periodontol*. 2018;89(1):304–12.

33. Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE. Peri-implant mucositis. *J Periodontol*.

2018;89(1):257–66.

34. Abrahamsson I, Soldini C. Probe penetration in periodontal and peri-implant tissues. An experimental study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(6):601–5.

35. Tanner A, Maiden MFJ, Lee K, Shulman LB, Weber HP. Dental implant infections. *Clin Infect Dis.* 1997;25(2):213–7.

36. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(3):721–64.

37. Serino G, Turri A, Lang NP. Probing at implants with peri-implantitis and its relation to clinical peri-implant bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(1):91–5.

38. Etter TH, Håkanson I, Lang NP, Trejo PM, Caffesse RG, Trejo PM, et al. Healing after standardized clinical probing of the periimplant soft tissue seal: a histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(6):571–80.

39. Lang NP, Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG. Histologic probe penetration in healthy and inflamed peri-implant tissues. *Clin Oral Implants Res.* 1994;5(4):191–201.

40. Schou S, Holmstrup P, Stoltze K, Hjørting-Hansen E, Fiehn N-E, Skovgaard LT. Probing around implants and teeth with healthy or inflamed peri-implant mucosa/gingiva. A histologic comparison in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(2):113–26.

41. Luterbacher S, Mayfield L, Brägger U, Lang NP. Diagnostic characteristics of clinical and microbiological tests for monitoring periodontal and peri-implant mucosal tissue conditions during supportive periodontal therapy (SPT). *Clin Oral Implants Res.* 2000;11(6):521–9.

42. Heitz-Mayfield LJA. Peri-implant diseases: Diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):292–304.

43. Coli P, Christiaens V, Sennerby L, Bruyn H De. Reliability of periodontal diagnostic tools for monitoring peri-implant health and disease. *Periodontol.* 2017;73(1):203–17.

44. Ericsson I, Lindhe J. Probing depth at implants and teeth. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 1993;20(9):623–7.
45. Roos-Jansåker A-M, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. *J Clin Periodontol.* 2006;33(4):296–301.
46. Fransson C, Wennström J, Berglundh T. Clinical characteristics at implants with a history of progressive bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(2):142–7.
47. Kullman L, Al-Asfour A, Zetterqvist L, Andersson L. Comparison of radiographic bone height assessments in panoramic and intraoral radiographs of implant patients. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007;22(1):96–100.
48. Mengel R, Kruse B, Flores-de-Jacoby L. Digital volume tomography in the diagnosis of peri-implant defects: an in vitro study on native pig mandibles. *J Periodontol.* 2006;77(7):1234–41.
49. García-García M, Mir-Mari J, Benic GI, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E. Accuracy of periapical radiography in assessing bone level in implants affected by peri-implantitis: a cross-sectional study. *J Clin Periodontol.* 2016;43(1):85–91.
50. Zani SR, Moss K, Shibli JA, Teixeira ER, de Oliveira Mairink R, Onuma T, et al. Peri-implant crevicular fluid biomarkers as discriminants of peri-implant health and disease. *J Clin Periodontol.* 2016;43(10):825–32.
51. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):282–5.
52. Sousa V, Mardas N, Farias B, Petrie A, Needleman I, Spratt D, et al. A systematic review of implant outcomes in treated periodontitis patients. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(7):787-844.
53. Saaby M, Karring E, Schou S, Isidor F. Factors influencing severity of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2014;27(1):1–6.
54. Schou S. Implant treatment in periodontitis-susceptible patients: a systematic review. *J Oral Rehabil.* 2008;35(1):9–22.
55. Mombelli A, Décaillot F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J*

Clin Periodontol. 2011;38(11):203–13.

56. Clementini M, Rossetti PHO, Penarrocha D, Micarelli C, Bonachela WC, Canullo L. Systemic risk factors for peri-implant bone loss: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014;43(3):323–34.

57. Malmstrom HS, Fritz ME, Timmis DP, Van Dyke TE. Osseo-integrated implant treatment of a patient with rapidly progressive periodontitis. A case report. *J Periodontol.* 1990;61(5):300–4.

58. Fardal Ø, Linden GJ. Tooth loss and implant outcomes in patients refractory to treatment in a periodontal practice. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):733-8.

59. Matarasso S, Rasperini G, Iorio Siciliano V, Salvi GE, Lang NP, Aglietta M. A 10-year retrospective analysis of radiographic bone-level changes of implants supporting single-unit crowns in periodontally compromised vs. periodontally healthy patients. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(9):898–903.

60. Rocuzzo M, De Angelis N, Bonino L, Aglietta M. Ten-year results of a three-arm prospective cohort study on implants in periodontally compromised patients. Part 1: Implant loss and radiographic bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(5):490–6.

61. Leonhardt A, Gröndahl K, Bergström C, Lekholm U. Long-term follow-up of osseointegrated titanium implants using clinical, radiographic and microbiological parameters. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(2):127–32.

62. Karoussis IK, Kotsovilis S, Fourmousis I. A comprehensive and critical review of dental implant prognosis in periodontally compromised partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(6):669–79.

63. Klokkevold PR, Han TJ. How do smoking, diabetes, and periodontitis affect outcomes of implant treatment? *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007;22:173–202

64. Mengel R, Flores-de-Jacoby L. Implants in patients treated for generalized aggressive and chronic periodontitis: a 3-year prospective longitudinal study. *J Periodontol.* 2005;76(4):534–43.

65. De Boever AL, Quirynen M, Coucke W, Theuniers G, De Boever JA. Clinical and radiographic study of implant treatment outcome in periodontally susceptible and non-susceptible patients: a prospective long-term study. *Clin Oral Implants Res.*

2009;20(12):1341–50.

66. Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. *J Periodontol.* 2010;81(2):231–8.

67. Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJA, Brägger U, Hämmerle CHF, Lang NP. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(3):329–39.

68. Roos-Jansåker A-M, Lindahl C, Renvert H, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions. *J Clin Periodontol.* 2006;33(4):290–5.

69. García-Bellosta S, Bravo M, Subirá C, Echeverría JJ. Retrospective study of the long-term survival of 980 implants placed in a periodontal practice. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25(3):613–9.

70. Kehl M, Swierkot K, Mengel R. Three-dimensional measurement of bone loss at implants in patients with periodontal disease. *J Periodontol.* 2011;82(5):689–99.

71. Saaby M, Karring E, Schou S, Isidor F. Factors influencing severity of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(1):7–12.

72. Aguirre-Zorzano LA, Estefana-Fresco R, Telletxea O, Bravo M. Prevalence of peri-implant inflammatory disease in patients with a history of periodontal disease who receive supportive periodontal therapy. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(11):1338–44.

73. Carlsson GE, Lindquist LW, Jemt T. Long-term marginal periimplant bone loss in edentulous patients. *Int J Prosthodont.* 2000;13(4):295–302.

74. Fransson C, Wennström J, Tomasi C, Berglundh T. Extent of peri-implantitis-associated bone loss. *J Clin Periodontol.* 2009;36(4):357–63.

75. Galindo-Moreno P, Fauri M, Avila-Ortiz G, Fernández-Barbero JE, Cabrera-León A, Sánchez-Fernández E. Influence of alcohol and tobacco habits on peri-implant marginal bone loss: a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(5):579–86.

76. Monje A, Catena A, Borgnakke WS. Association between diabetes

mellitus/hyperglycaemia and peri-implant diseases: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2017;44(6):636–48.

77. Ting M, Craig J, Balkin BE, Suzuki JB. Peri-implantitis: A Comprehensive Overview of Systematic Reviews. *J Oral Implantol*. 2018;44(3):225-47.

78. Duarte PM, Serrão CR, Miranda TS, Zanatta LCS, Bastos MF, Faveri M, et al. Could cytokine levels in the peri-implant crevicular fluid be used to distinguish between healthy implants and implants with peri-implantitis? A systematic review. *J Periodontal Res*. 2016;51(6):689–98.

79. Serino G, Ström C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: Association with inadequate plaque control. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(2):169–74.

80. Katafuchi M, Weinstein BF, Leroux BG, Chen Y-W, Daubert DM. Restoration contour is a risk indicator for peri-implantitis: A cross-sectional radiographic analysis. *J Clin Periodontol*. 2018;45(2):225-32.

81. Rinke S, Ohl S, Ziebolz D, Lange K, Eickholz P. Prevalence of periimplant disease in partially edentulous patients: a practice-based cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22(8):826–33.

82. Costa FO, Takenaka-Martinez S, Cota LOM, Ferreira SD, Silva GLM, Costa JE. Peri-implant disease in subjects with and without preventive maintenance: a 5-year follow-up. *J Clin Periodontol*. 2012;39(2):173–81.

83. Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C. Long-term marginal bone loss in 217 machined-surface implants placed in 68 patients with 5 to 9 years of follow-up: a retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012;27(5):1163–9.

84. Safii SH, Palmer RM, Wilson RF. Risk of implant failure and marginal bone loss in subjects with a history of periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2010;12(3):165–74.

85. Wilson TG, Valderrama P, Burbano M, Blansett J, Levine R, Kessler H, et al. Foreign bodies associated with peri-implantitis human biopsies. *J Periodontol*. 2015;86(1):9–15.

86. Korsch M, Robra B-P, Walther W. Predictors of excess cement and tissue

response to fixed implant-supported dentures after cementation. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015;17(1):45-53.

87. Rammelsberg P, Lorenzo-Bermejo J, Kappel S. Effect of prosthetic restoration on implant survival and success. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(10):1296-1302.

88. Galindo-Moreno P, Fernández-Jiménez A, Avila-Ortiz G, Silvestre FJ, Hernández-Cortés P, Wang HL. Marginal bone loss around implants placed in maxillary native bone or grafted sinuses: A retrospective cohort study. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(3):378-84.

89. Galindo-Moreno P, León-Cano A, Ortega-Oller I, Monje A, O'valle F, Catena A. Marginal bone loss as success criterion in implant dentistry: Beyond 2 mm. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(4):e28-34.

90. Peñarrocha-Diago MA, Flichy-Fernández AJ, Alonso-González R, Peñarrocha-Oltra D, Balaguer-Martínez J, Peñarrocha-Diago M. Influence of implant neck design and implant-abutment connection type on peri-implant health. Radiological study. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(11):1192-200.

91. Monje A, Suarez F, Galindo-Moreno P, García-Nogales A, Fu JH, Wang HL. A systematic review on marginal bone loss around short dental implants (<10 mm) for implant-supported fixed prostheses. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(10):1119-24.

92. Canullo L, Iannello G, Peñarrocha M, Garcia B. Impact of implant diameter on bone level changes around platform switched implants: preliminary results of 18 months follow-up a prospective randomized match-paired controlled trial. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(10):1142-6.

93. Gil, FJ, Rodríguez A, Espinar E, Llamas JM, Padullés E, Juárez A. Effect of oral bacteria on the mechanical behaviour of titanium dental implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;27(1):64-8.

94. Yu F, Addison O, Baker SJ, Davenport AJ. Lipopolysaccharide inhibits or accelerates biomedical titanium corrosion depending on environmental acidity. *Int J Oral Sci.* 2015;7(3):179-86.

95. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):286-91.

96. Argimón Pallas J, Jiménez Villa J (eds). *Métodos de Investigación. Aplicados a la atención primaria de salud*. Doyma: Barcelona; 1991. 206-207.
97. Fransson C, Lekholm U, Jemt T, Berglundh T. Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(4):440-6.
98. Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. The association between selected risk indicators and severity of peri-implantitis using mixed model analyses. *J Clin Periodontol*. 2011;38(3):285-92.
99. Zetterqvist L, Feldman S, Rotter B, Vincenzi G, Wennström JL, Chierico A, et al. A prospective, multicenter, randomized-controlled 5-year study of hybrid and fully etched implants for the incidence of peri-implantitis. *J Periodontol*. 2010;81(4):493-501.
100. Merli M, Bernardelli F, Giulianelli E, Toselli I, Moscatelli M, Pagliaro U, et al. Inter-rater agreement in the diagnosis of mucositis and peri-implantitis. *J Clin Periodontol*. 2014;41(9):927-33.
101. Cortés Martinicorena FJ. Medición de la salud y la enfermedad en odontología comunitaria. In: Cuenca Sala E, Baca García P. (eds). *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones*. 3rd ed. Barcelona: Masson; 2005. p. 337-79.
102. Ferreira SD, Silva GLM, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol*. 2006;33(12):929-35.
103. Cercadillo-Ibarguren I, Sánchez-Torres A, Figueiredo R, Schwarz F, Gay-Escoda C, Valmaseda-Castellón E. Immediately loaded implant-supported full-arches: Peri-implant status after 1 – 9 years in a private practice. *J Dent*. 2017;67:72-6.
104. Passoni BB, Dalago HR, Schuldt Filho G, Oliveira de Souza JG, Benfatti CAM, Magini Rde S, et al. Does the number of implants have any relation with peri-implant disease? *J Appl Oral Sci*. 2014;22(5):403-8.
105. Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE, Mombelli A, Loup P-J, Heitz F, Kruger E, et al. Supportive peri-implant therapy following anti-infective surgical peri-implantitis treatment: 5-year survival and success. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29(1):1-6.
106. Heitz-Mayfield LJA, Mombelli A. The therapy of peri-implantitis: a systematic

review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29:325–45.

107. Renvert S, Roos-Jansåker AM, Claffey N. Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: A literature review. *J Clin Periodontol*. 2008;35(8):305–15.

108. Renvert S, Lessem J, Dahlén G, Renvert H, Lindahl C. Mechanical and repeated antimicrobial therapy using a local drug delivery system in the treatment of peri-implantitis: a randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2008;79(5):836–44.

109. Graziani F, Figuero E, Herrera D. Systematic review of quality of reporting, outcome measurements and methods to study efficacy of preventive and therapeutic approaches to peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*. 2012;39(12):224–44.

110. Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE, Mombelli A, Faddy M, Lang NP. Anti-infective surgical therapy of peri-implantitis. A 12-month prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(2):205–10.

111. Buitrago Vera PJ, Enrile de Rojas FJ. Diagnóstico, tratamiento y prevención de la mucositis periimplantaria y la periimplantitis. *J Implant Reconstr Dent*. 2016;7(1):5–37.

112. Monje A, Aranda L, Diaz KT, Alarcón MA, Bagramian RA, Wang HL, et al. Impact of maintenance therapy for the prevention of peri-implant diseases: A systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*. 2016;95(4):372–9.

113. Offenbacher S, Barros SP, Singer RE, Moss K, Williams RC, Beck JD. Periodontal disease at the biofilm–gingival interface. *J Periodontol*. 2007;78(10):1911–25.

114. Bravo Perez, M, Almerich Silla, JM, Ausina Márquez, V, Avilés Gutierrez, P, Blanco Gonzalez, JM, Canorea Díaz, et al. Encuesta de Salud Oral en España 2015. RECOE. 2016;21(1):8–48.

115. Bravo-Pérez M, Casals-Peidro E, Cortés-Martinicorena, FJ, Llodra-Calvo JC. Encuesta de Salud Oral en España 2005. RECOE. 2006;11(4):409–56.

116. Heitz-Mayfield LJA, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol 2000*. 2010;53:167–81.

117. Lindhe JK, Thorkild MA. The anatomy of periodontal tissues. In: Lindhe, J Lang, NP Karring T (eds). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 5th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. 3–49.

118. Berglundh T, Lindhe J. Dimension of the periimplant mucosa. Biological width revisited. *J Clin Periodontol*. 1996;23(10):971-3.
119. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res*. 1991;2(2):81-90.
120. Lindhe J, Berglundh T. The mucosa at teeth and implants. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, (eds.). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 5th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. 69-85.
121. Donath K. Pathogenesis of bony pocket formation around dental implants. *J Dent Assoc S Afr*. 1992;47(5):204-8.
122. Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014;16(2):155-65.
123. Kiname, Dennis F, Lindhe J. Patogenia de la periodontitis. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, (eds). *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 3rd ed. Madrid: Médica Panamericana; 2000. 191-228.
124. Becker ST, Beck-Broichsitter BE, Graetz C, Dörfer CE, Wiltfang J, Häsler R. Peri-Implantitis versus periodontitis: Functional differences indicated by transcriptome profiling. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014;16(3):401-11.
125. Lang NP, Berglundh T. Periimplant diseases: Where are we now? - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011;38(11):178-81.
126. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89:S313-8.
127. Berglundh T, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg B. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 1992;3(1):1-8.
128. Chvartzaid D, Koka S, Zarb G. Osseointegration - on continuing synergies in surgery, prosthodontics, biomaterials. Zarb G, Albrektsson T, Baker G, Eckert S, Stanford

C, Tarnow D, (eds.). Chicago: Quintessence; 2008. 157-164.

129. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Imp Res.* 2006;17(2):68–81.

130. Zaugg LK, Astasov-Frauenhoffer M, Braissant O, Hauser-Gerspach I, Waltimo T, Zitzmann NU. Determinants of biofilm formation and cleanability of titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(4):469-75.

131. Salvi GE, Fürst MM, Lang NP, Persson GR. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(3):242–8.

132. Kotsovilis S, Karoussis IK, Trianti M, Fourmoussis I. Therapy of peri-implantitis: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008;35(7):621–9.

133. Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater.* 2004;7(8):37–57.

134. Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(1):1–19.

135. Lang NP, Mombelli A, Attström R. Oral biofilm and calculus. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, (eds.). *Clinical periodontology and Implant Dentistry.* 5th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 183–206.

136. Serrano J, Herrera D, Arriba L De, Roldán S. ¿Qué es un biofilm bacteriano?. *Periodoncia y Oseointegración.* 2013;23(2):115-24.

137. Vuotto C, Donelli G. Anaerobes in biofilm-based healthcare-associated Infections. *Adv Exp Med Biol.* 2015;830:97-112.

138. Almaguer-Flores A, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Ximénez-Fyvie LA, Schwartz Z, Boyan BD. Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces in vitro. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(3):301-7.

139. Quirynen M, Papaioannou W, van Steenberghe D. Intraoral transmission and the

colonization of oral hard surfaces. *J Periodontol.* 1996;67(10):986–93.

140. Schwarz F, Sculean A, Wieland M, Horn N, Nuesry E, Bube C, et al. Effects of hydrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces on initial supragingival plaque biofilm formation. A pilot study. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2007;11(6):333–8.

141. Schwarz F, Ferrari D, Hertel M, Mihatovic I, Wieland M, Sager M, et al. Effects of surface hydrophilicity and microtopography on early stages of soft and hard tissue integration at non-submerged titanium implants: an immunohistochemical study in dogs. *J Periodontol.* 2007;78(11):2171–84.

142. Absolom DR, Zingg W, Neumann AW. Protein adsorption to polymer particles: role of surface properties. *J Biomed Mater Res.* 1987;21(2):161–71.

143. Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res.* 1993;72(9):1304–9.

144. Tanner J, Robinson C, Söderling E, Vallittu P. Early plaque formation on fibre-reinforced composites in vivo. *Clin Oral Investig.* 2005;9(3):154–60.

145. Quirynen M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 2001;28(6):499–507.

146. Chen T, Yu W-H, Izard J, Baranova O V, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford).* 2010;2010(0):baq013.

147. Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol.* 2010;81(1):89–98.

148. Müller HP, Heinecke A, Borneff M. A statistical approach to the ecology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(5):945–52.

149. Papapanou PN. Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease. *Ann Periodontol.* 2002;7(1):54–61.

150. Nalbant A, Zadeh HH. Actinobacillus actinomycetemcomitans induces apoptosis of T lymphocytes by the Fas and Fas ligand pathway. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(5):277–84.
151. Rams TE, Link CC. Microbiology of failing dental implants in humans: electron microscopic observations. *J Oral Implantol.* 1983;11(1):93–100.
152. Rams TE, Roberts TW, Tatum H, Keyes PH. The subgingival microbial flora associated with human dental implants. *J Prosthet Dent.* 1984;51(4):529–34.
153. Danser MM, van Winkelhoff AJ, de Graaff J, Loos BG, van der Velden U. Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membranes. *J Clin Periodontol.* 1994;21(7):484–9.
154. Danser MM, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. Periodontal bacteria colonizing oral mucous membranes in edentulous patients wearing dental implants. *J Periodontol.* 1997;68(3):209–16.
155. Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodontol Res.* 1989;24(2):96–105.
156. Quirynen M, Listgarten MA. Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Brånemark. *Clin Oral Implants Res.* 1990;1(1):8–12.
157. Papaioannou W, Quirynen M, Van Steenberghe D. The influence of periodontitis on the subgingival flora around implants in partially edentulous patients. *Clin Oral Impl Res.* 1996;7(4):405–9.
158. van Winkelhoff FT, Goené RJ, Benschop C, Folmer T. Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. *Clin Oral Impl Res.* 2000;11(6):511–20.
159. Quirynen M, Vogels R, Peeters W, Van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of “pristine” peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(1):25–37.
160. Quirynen M, Teughels W. Microbiologically compromised patients and impact on oral implants. *Periodontol 2000.* 2003;33:119–28.

161. Buchmann R, Khoury F, Pingel D, Lange DE. The microflora recovered from the outer-surfaces of the Frialit-2 implanto- prosthetic connector. *Clin Oral Impl Res.* 2003;14(1):28–34.
162. Eick S, Ramseier CA, Rothenberger K, Brägger U, Buser D, Salvi GE. Microbiota at teeth and implants in partially edentulous patients. A 10-year retrospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(2):218-25.
163. Lima EM, Koo H, Vacca Smith AM, Rosalen PL, Del Bel Cury AA. Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(8):780–5.
164. Gerber J, Wenaweser D, Heitz-Mayfield L, Lang NP, Rutger Persson G. Comparison of bacterial plaque samples from titanium implant and tooth surfaces by different methods. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(1):1–7.
165. Keller W, Brägger U, Mombelli A. Peri-implant microflora of implants with cemented and screw retained suprastructures. *Clin Oral Implants Res.* 1998;9(4):209–17.
166. Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Ohkuma M, Izumi Y. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. *J Oral Microbiol.* 2010;2(14):1–7.
167. Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Bürgers R. Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(8):866–72.
168. Blanc V, Isabal S, Sánchez MC, Llama-Palacios A, Herrera D, Sanz M, et al. Characterization and application of a flow system for in vitro multispecies oral biofilm formation. *J Periodontal Res.* 2014;49(3):323–32.
169. Hahnel S, Wieser A, Lang R, Rosentritt M. Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(11):1297-301.
170. Zhao B, van der Mei HC, Subbiahdoss G, de Vries J, Rustema-Abbing M, Kuijjer R, et al. Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. *Dent Mater.* 2014;30(7):716–27.
171. Lang NP, Monbelli A. Oral biofilms and calculus. In: Lindhe J, Lang NP, Karring

T (eds.). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Blackwell Munksgaard; 2008.

172. Tegoulia VA. Staphylococcus aureus adhesion to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and fibrinogen presence. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2002;24(3-4):217-28.

173. Bizzarro S, Loos BG, Laine ML, Crielaard W, Zaura E. Subgingival microbiome in smokers and non-smokers in periodontitis: an exploratory study using traditional targeted techniques and a next-generation sequencing. *J Clin Periodontol*. 2013;40(5):483-92.

174. Mombelli A, Oosten MAC, Schürch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol*. 1987;2(4):145-51.

175. Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group. 16S 454 Sequencing Protocol HMP Consortium. Version 4.2.2. 2010. Available from DACC website: 1-14.

176. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51(1):263-73.

177. Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, et al. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*. 2008;19(9):386.

178. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(16):5261-7.

179. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:141-5.

180. Futami R, Muñoz-Pomer A, Viu JM, Domínguez-Escribà L, Covelli L, Bernet GP, Sempere JM, Moya A, Llorens C. GPRO: the professional tool for management, functional analysis and annotation of omic sequences and databases. *Biotechnol Bioinforma*. 2011;1:1-5.

181. Chen J, Bittinger K, Charlson ES, Hoffmann C, Lewis J, Wu GD, et al. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics*. 2012;28(16):2106–13.
182. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134–44.
183. OSU CORE Database, Oral Microbiome [Internet]. Disponible en: <http://microbiome.osu.edu/sequences>.
184. Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gøtzsche PC, Devereaux PJ, et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *Int J Surg*. 2012;10(1):28–55.
185. Declaración de Helsinki de la Asociación Mundial de Medicina. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos [Internet]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-ammprincipios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>.
186. Cortés-Acha B, Figueiredo R, Seminago R, Roig FJ, Llorens C, Valmaseda-Castellón E. Microbiota analysis of biofilms on experimental abutments mimicking dental implants: An in vivo model. *J Periodontol*. 2017;88(10):1090-1104.
187. Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, Ren Q. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol*. 2015;15(1):36.
188. Albrektsson T, Canullo L, Cochran D, De Bruyn H. Peri-Implantitis: A Complication of a foreign body or a man-made disease. Facts and fiction. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016;18(4):840–9.
189. Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014;16(2):155–65.
190. Tonetti MS, Chapple ILC, Jepsen S, Sanz M. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*. 2015;42(16):1–4.
191. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167–93.

192. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002;28:12–55.
193. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*. 2005;32(6):7–15.
194. Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc*. 2006;137:10–5.
195. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol*. 2003;11(2):94–100.
196. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000;182(10):2675–9.
197. Yilmaz O, Young PA, Lamont RJ, Kenny GE. Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microbiology*. 2003;149(9):2417–26.
198. Westas E, Gillstedt M, Lönn-Stensrud J, Bruzell E, Andersson M, Lönn-Stensrud J, et al. Biofilm formation on nanostructured hydroxyapatite-coated titanium. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2014;102(4):1063–70.
199. Schmidlin PR, Müller P, Attin T, Wieland M, Hofer D, Guggenheim B. Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. *J Appl Oral Sci*. 2013;21(1):48-55.
200. Gil FJ, Rodriguez A, Espinar E, Llamas JM, Padullés E, Juárez A. Effect of oral bacteria on the mechanical behavior of titanium dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012;27(1):64–8.
201. Thurnheer T, Belibasakis GN. Incorporation of staphylococci into titanium-grown biofilms: an in vitro " submucosal " biofilm model for peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27(7):890-5.
202. Martínez-Hernández M, Olivares-Navarrete RR, Almaguer-Flores A, Martínez-Hernández M, Olivares-Navarrete RR, Almaguer-Flores A. Influence of the periodontal status on the initial-biofilm formation on titanium surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016;18(1):174–81.

203. Covani U, Marconcini S, Crespi R, Barone A. Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces. *Implant Dent.* 2006;15(3):298–304.
204. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach F-W, et al. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008;23(2):327–34.
205. Rimondini L, Farè S, Brambilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, et al. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *J Periodontol.* 1997;68(6):556–62.
206. Ferreira Ribeiro C, Cogo-Müller K, Franco GC, Silva-Concilio LR, Sampaio Campos M, de Mello Rode S, et al. Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. *Arch Oral Biol.* 2016;69:33–9.
207. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res.* 2000;79(1):21–7.
208. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: An in vivo human study. *J Periodontol.* 2004;75(2):292–6.
209. Quirynen M, Van Assche N. RCT comparing minimally with moderately rough implants. Part 2: Microbial observations. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(5):625–34.
210. Grössner-Schreiber B, Teichmann J, Hannig M, Dörfer C, Wenderoth DF, Ott SJ. Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(8):817–26.
211. Zaugg LK, Astasov-Frauenhoffer M, Braissant O, Hauser-Gerspach I, Waltimo T, Zitzmann NU. Determinants of biofilm formation and cleanability of titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(4):469-475.
212. Grössner-Schreiber B, Teichmann J, Hannig M, Dörfer C, Wenderoth DF, Ott SJ. Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(8):817-26.
213. Vignoletti F, de Sanctis M, Berglundh T, Abrahamsson I, Sanz M. Early healing of implants placed into fresh extraction sockets: an experimental study in the beagle dog.

III: soft tissue findings. *J Clin Periodontol.* 2009;36(12):1059–66.

214. Tomasi C, Tessarolo F, Caola I, Wennström J, Nollo G, Berglundh T. Morphogenesis of peri-implant mucosa revisited: an experimental study in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(9):997–1003.

215. Tomasi C, Tessarolo F, Caola I, Piccoli F, Wennström JL, Nollo G, et al. Early healing of peri-implant mucosa in man. *J Clin Periodontol.* 2016;43(10):816–24.

216. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24(4):616–26.

217. Marsh PD. Dental Biofilms. In: Lang NP, Lindhe J, (eds.). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* Sixth Edition. Sussex: Wiley Blackwell; 2015. p. 169–79.

218. Harris LG, Richards RG. Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury.* 2006;37(2):3-14.

219. Tallarico M, Canullo L, Caneva M, Özcan M. Microbial colonization at the implant-abutment interface and its possible influence on periimplantitis: A systematic review and meta-analysis. *J Prosthodont Res.* 2017;61(3):233–41.

220. De Boever AL, De Boever JA. Early colonization of non-submerged dental implants in patients with a history of advanced aggressive periodontitis. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(1):8–17.

221. Robitaille N, Reed DN, Walters JD, Kumar PS, Kumar P. Periodontal and peri-implant diseases: identical or fraternal infections? *Mol Oral Microbiol.* 2016;31(4):285-301.

222. Lafaurie GI, Sabogal MA, Castillo DM, Rincón MV, Gómez LA, Lesmes YA, et al. Microbiome and microbial biofilm profiles of peri-implantitis: A systematic review. *J Periodontol.* 2017;88(10):1066–89.

223. Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(6):791-800.

224. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(3):486–505.

225. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;28:12–55.
226. Dreyer H, Grischke J, Tiede C, Eberhard J, Schweitzer A, Toikkanen SE, et al. Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: A systematic review. *J Periodontal Res*. 2018;53(5):657–81.
227. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang H-L. Peri-implantitis. *J Periodontol*. 2018;89(1):267–90.
228. Liñares J, Martín-Herrero JE. Bases farmacomicrobiológicas del tratamientos antibiótico de las enfermedades periodontales y periimplantarias. *Avances en Periodoncia*. 2003;15(3):139–47.
229. Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol*. 2015;23:141–7.
230. Zhuang LF, Watt RM, Mattheos N, Si MS, Lai HC, Lang NP. Periodontal and peri-implant microbiota in patients with healthy and inflamed periodontal and peri-implant tissues. *Clin Oral Impl Res*. 2016;27:13–21.

XIV ANEXOS

Conformidad de la dirección del centro del estudio I



CONFORMIDAD DE LA DIRECCION DEL CENTRO

Dr. Josep M^a Ustrell Torrent, Director Facultativo del Hospital Odontològic Universitat de Barcelona y vista la autorización del Comité Ético de Investigación Clínica,

CERTIFICA

Que conoce la propuesta realizada por el promotor Dr. Eduardo Valmaseda para que sea realizado en este Centro el estudio código de protocolo 2014-05 titulado "Colonización microbiana de superficies de implantes. Identificación bacteriana a través de pirosecuenciación." y que será realizado por los titulados Drs. Eduardo Valmaseda y Rui Figueiredo como investigadores principales y como colaboradores los titulados: Berta Cortés Acha, Javier Mir Marí y Javier Costa Berenguer

Que acepta la realización de dicho estudio en este Centro.

Lo que firma en Hospitalet de Llobregat, a 19 de diciembre de 2014

Firmado:

Dr. Josep M^a Ustrell



Conformidad de la dirección del centro del estudio II



CONFORMIDAD DE LA DIRECCION DEL CENTRO

Dr. Josep M^a Ustrell, Director Facultativo del Hospital Odontològic Universitat de Barcelona y
vista la autorización del Comitè Ètic de Investigació Clínica,

CERTIFICA

Que conoce la propuesta realizada por el promotor para que sea realizado en este Centro el estudio código de protocolo 2014-21 titulado: "Estudio preliminar sobre la distribución y cantidad de biofilm sobre la superficie de implantes" y que será realizado por los titulados Drs. EDUARD VALMASEDA CASTELLÓN y RUI FIGUEIREDO como investigadores principales y como colaboradores los titulados Drs. VANESSA BLANC Y RUBEN LEÓN y la Lda. BERTA CORTÉS

Que acepta la realización de dicho estudio en este Centro.

Lo que firma en Hospitalet de Llobregat, a 11 de mayo de 2015

Firmado:

Dr. Josep M^a Ustrell



Resolución del Comité de Ética del estudio I



Hospital
Odontològic

Universitat de Barcelona

Comitè d'Ètica i Investigació Clínica



FUNDACIÓ
JOSEP FINESTRES
UNIVERSITAT DE BARCELONA

SILVIA SANCHEZ GONZALEZ, Secretario/a del **CEIC HOSPITAL ODONTOLÒGIC UNIVERSITAT DE BARCELONA**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor del estudio:

CÓDIGO: **2014-05** NÚMERO EUDRACT:

VERSIÓN: 2ª fecha: 26 de febrero de 2014.

TÍTULO: Colonización microbiana de superficies de implantes. Identificación bacteriana a través de pirosecuenciación.

PROMOTOR: Dr. Eduard Valmaseda

considera que:

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero y las normas que lo desarrollan, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC habiendo tenido en cuenta las respuestas a las aclaraciones solicitadas al promotor resuelve **AUTORIZAR** que dicho estudio sea realizado en los centros siguientes por los investigadores principales que se relacionan a continuación





**Hospital
Odontològic**

Universitat de Barcelona
Comitè d'Ètica i Investigació Clínica



FUNDACIÓ
JOSEP FINESTRES
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Centro: Hospital Odontològic Universitat de Barcelona

Investigadores principales: Dr. Eduardo Valmaseda y Dr. Rui Figueiredo

Que el Comitè tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 223/2004, y su composición actual es la siguiente:

Presidente:

- M^a EULALIA PLANAS DOMINGO

Secretario:

- SILVIA SANCHEZ GONZALEZ

Vocales:

- JORDI ALBELLA RUBIO
- DAVID BAGÁN PEIRO
- MARINA BALANZO JOUE
- LEONARDO BERINI AYTÉS
- ENRIC GIRALT DE VECIANA
- JOSE LOPEZ LOPEZ
- JORDI MARTINEZ GOMIS
- VIRGINIA NOVEL MARTÍ
- JOSEP MARIA RAMON TORRELL
- OLGA SERRA ESCARP
- ISABEL MORENO PULIDO
- YOLANDA PUIGGRÓS JIMENEZ DE ANTA

Como queda reflejado en el Acta de 28 de enero de 2014

Lo que firmo en L'Hospitalet de Llobregat, a 18 de diciembre de 2014

SILVIA SANCHEZ GONZALEZ
Secretaria del CEIC



Hospital Odontològic
Universitat de Barcelona

C.E.I.C.

Comitè d'ètica d'investigació clínica

Resolución del Comité de Ética del estudio II



SILVIA SANCHEZ GONZALEZ, Secretario/a del **CEIC HOSPITAL ODONTOLÒGIC UNIVERSITAT DE BARCELONA**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor del estudio:

CÓDIGO: 2014-21 NÚMERO EUDRACT:

VERSIÓN: . 3ª versió 20 abril de 2015

TÍTULO: Estudio preliminar sobre la distribución y cantidad de biofilm sobre la superficie de implantes.

PROMOTOR: Laboratorios Dentaïd

Y considera que:

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero y las normas que lo desarrollan, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC como comité de referencia y, habiendo tenido en cuenta las respuestas a las aclaraciones solicitadas al promotor, resuelve **AUTORIZAR** que dicho estudio sea realizado en los centros siguientes por los investigadores principales que se relacionan a continuación:





**Hospital
Odontològic**

Universitat de Barcelona

Comitè d'Ètica i Investigació Clínica



FUNDACIÓ
JOSEP FINESTRES
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Centro: Hospital Odontològic Universitat de Barcelona

Investigadores principales: Drs. Eduard Valmaseda y Rui Figueiredo

Que el Comitè tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 223/2004, y su composición actual es la siguiente:

Presidente:

- LEONARDO BERINI AYTÉS

Secretario:

- SILVIA SANCHEZ GONZALEZ

Vocales:

- JORDI ALBELLA RUBIO
- DAVID BAGÁN PEIRO
- MARINA BALANZO JOUE
- ENRIC GIRALT DE VECIANA
- JOSE LOPEZ LOPEZ
- JORDI MARTINEZ GOMIS
- VIRGINIA NOVEL MARTÍ
- JOSEP MARIA RAMON TORRELL
- OLGA SERRA ESCARP
- ISABEL MORENO PULIDO
- YOLANDA PUIGGRÒS JIMENEZ DE ANTA
- PILAR HEREU BOHER

Como queda reflejado en el Acta 4/2015

Lo que firmo en L'Hospitalet de Llobregat, a 08 de mayo de
2015

Silvia Sanchez Gonzalez

SILVIA SANCHEZ GONZALEZ



Beca



Degana

Facultat d'Odontologia

C/ Beica Llarga, s/n
Pavelló de Govern, 2a Planta
Campus de Ciències de Salut de Bellvitge
08907 L'Hospitalet de Llobregat

Tel. +34 934 021 255
Fax +34 934 035 927
dega-odontologia@ub.edu
www.ub.edu

Berta Cortes Acha
C. Villarroel, 15
08011 Barcelona

Senyora,

Us comunico que us ha estat concedit un ajut d'import de **4.560 €** per a les despeses que se'n derivin del vostre projecte d'investigació, dins de la XVI convocatòria d'ajuts per a estudiants de doctorat i postgrau de la Facultat d'Odontologia.

- Per tal de tramitar la compra i les factures que van amb càrrec a l'ajut us heu de dirigir a l'Oficina d' Afers Generals (Pavelló de Govern, 1a planta), acompanyats d'aquest escrit. L'import concedit ha d'estar compromès amb comandes als proveïdors abans del **30 de novembre de 2013**.

Atentament,



Silvia Sánchez
Degana

L'Hospitalet de Llobregat, 30 de setembre de 2013

Una Campanya d'Excel·lència Internacional:

B:KC

European
Association
of Centers

HUB

Health Universities
of Barcelona
Consort

Permiso de la editorial estudio I

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 10, 2019

This Agreement between Ms. Berta Cortés-Acha ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4557060487670
License date	Mar 27, 2019
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	JOURNAL OF PERIODONTOLOGY
Licensed Content Title	Microbiota Analysis of Biofilms on Experimental Abutments Mimicking Dental Implants: An In Vivo Model
Licensed Content Author	Berta Cortés-Acha, Rui Figueiredo, Ramón Seminago, et al
Licensed Content Date	Oct 1, 2017
Licensed Content Volume	88
Licensed Content Issue	10
Licensed Content Pages	15
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Características del biofilm oral formado sobre implantes dentales
Expected completion date	Jul 2019
Expected size (number of pages)	126
Requestor Location	Ms. Berta Cortés-Acha C/Aoiz nº7-6ªA Pamplona, Navarra 31004 Spain Attn: Ms. Berta Cortés-Acha
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright

Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS

OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes

all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License](#) (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library

<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Aceptación de publicación del estudio II

De: medoral.es <medoral@medoral.es>
Data: 6 de maio de 2019 20:28:30 GMT+2
Para: <ruiptigueiredo@hotmail.com>
Assunto: **MedOral_Ref.22868_Date. 2019-05-06_Accept**

Med Oral Patol Oral Cir Bucal

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2017: 41/91 (Q2) Dentistry, Oral Surgery & Medicine, JCR Impact Factor: 1.671

2019-05-06

Reference: 22868

Title: Development and viability of biofilms grown on experimental abutments mimicking dental implants: an in vivo model.

Dr. Rui Figueiredo
Email: ruiptigueiredo@hotmail.com
Password: lv9ugez3
www.medoral.es

Dear Dr,

Thank you for submitting your article for our consideration.

Your above referenced article with the following authors: Berta Cortés-Acha, Rui Figueiredo, Vanessa Blanc, Agnes Soler-Ollé, Ruben León, Eduard Valmaseda-Castellón, has been evaluated by the reviewers. We are happy to inform you that they have recommended accepting the manuscript for publication in *Medicina Oral Patología Oral Cirugía Bucal*.

We follow acceptance by date-order to establish the final publication of a manuscript.

Please complete the Copyright Transfer Agreement form available at <http://www.medicinaoral.com/copyright.htm> and the CONFLICT OF INTEREST

requirement available at http://www.medicinaoral.com/conflict_med.htm
They should be submitted to the Production Editor (email: secretaria4@medicinaoral.com). Please note that your paper cannot be published until we have received your signed Copyright Transfer Agreement and the conflict of interest.

We will publish the article according to the reviewers exact recommendations. We will only make minor changes, for example, any spelling mistakes, e.t.c.

This article will be first published in the AHEAD OF PRINT [AOP] version in PUBMED MEDLINE. Then, after some months, we will publish your article with full reference of the year, volume and page.

We very much appreciate your interest in our publication.

Yours sincerely.

Professor Jose V. Bagan
Editor Med Oral Patol Oral Cir Bucal
Indexed in: SCI-JCR, INDEX MEDICUS, MEDLINE, PUBMED, EMCARE, EMBASE, SCOPUS, IME

Diseño del pilar del estudio

LOS PLANOS SON CARACOTEROS

[Signature]

[Signature]

REVISIONES

REV	DESCRIPCIÓN	FECHA	APROBADO
1	Creación del documento	23/06/2013	MOZGO GRAU
2	Se actualiza la altura superior del tornillo	05/10/2013	MOZGO GRAU

SECCIÓN A-A

MOZGOGRAU®
 C/San Felipe Res. 2 / 47002 Valadores (SPAIN)
 Tfn: 983 309 602 / Fax: 983 304 021
 www.mozgo-grau.com

PR0251

FORMA: 23/09/2013
 ESCALA: 7:1
 MATERIAL: Titanio Grado IV
 PLANO Nº: 2

SALVO INDICACIÓN DE LO CONTRARIO EN LOS PLANOS
 ACABADO SUPERFICIAL: RA 0.40 µm
 TOLERANCIAS: LINEAL: 0.2 mm
 ANGULAR: 2°

GENERALIZACIÓN
**TORNILLO DE CICATRIZACIÓN OSSEOUS STD
 RP ALTURA 4 mm**

Formulario de recogida de datos

- Nº Historia:

- Sexo:

- Edad:

- Patologías Sistémicas:

- Medicación actual:

- Hábito tabáquico: _____ cig/día

- Tipo de edentulismo (por arcada):

Parcial

Total

- Estado Periodondal:

Sano

Enfermo

.Profundidad, Recesión, Sangrado al Sondaje y Supuración:

- Biotipo gingival:
- Datos del Implante:

Fecha colocación	Diámetro X Longitud	Posición	Distancia con adyacentes	Encía queratinizada	Prótesis	PPI	PSBI	Supuración

Profundidad de sondaje	Pérdida ósea

- Distancia: Diente (D), Implante (I), *x mm por mesial/x mm por distal*
- E. queratinizada: Ausencia (A), Presencia (P) y cantidad en mm
- Tipo de prótesis: Unitario (U), Puente (Pt)
- PPI: Medición índice placa periimplantario Mombelli:
 Pasar la sonda periodontal por el margen gingival (sin sondar)
 - 0.- No es posible detectar placa bacteriana
 - 1.- Placa detectable al pasar sonda por la parte lisa del implante
 - 2.- Placa visible a la inspección ocular
 - 3.- Gran acumulo de depósitos blancos sobre el implante
- PSBI: Medición índice sangrado periimplantario Mombelli:
 Pasar la sonda por el margen gingival (sin sondar)
 - 0.- No hay hemorragia
 - 1.- Visibles puntos aislados de hemorragia
 - 2.- Hemorragia confluye a lo largo de todo el margen
 - 3.- Hemorragia interna
- Profundidad de sondaje (*mayor profundidad obtenida*):
- Pérdida ósea: *mediante radiografía periapical digital con paralelizador*

Permiso de reproducción de la Figura 2 del artículo de Lafaurie y cols. 2017 (222)

RightsLink Printable License

15/4/19 10:30

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 15, 2019

This Agreement between Ms. Berta Cortés-Acha ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4570101069311
License date	Apr 15, 2019
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	JOURNAL OF PERIODONTOLOGY
Licensed Content Title	Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review
Licensed Content Author	Gloria Inés Lafaurie, María Alejandra Sabogal, Diana Marcela Castillo, et al
Licensed Content Date	Oct 1, 2017
Licensed Content Volume	88
Licensed Content Issue	10
Licensed Content Pages	24
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	2
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 2
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Características del biofilm oral formado sobre implantes dentales
Expected completion date	Jul 2019
Expected size (number of pages)	126
Requestor Location	Ms. Berta Cortés-Acha C/Aoiz nº7-6ºA Pamplona, Navarra 31004 Spain Attn: Ms. Berta Cortés-Acha
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with

<https://s100.copyright.com/App/PrintableLicenseFrame.jsp?publis...-a933-4020-9fed-5e5e921391dd%20%20&targetPage=printablelicense>

Página 1 de 5

Permiso de reproducción de la Figura 1 del artículo de Bürgers y cols. 2010 (14)

RightsLink Printable License

15/4/19 10:36

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 15, 2019

This Agreement between Ms. Berta Cortés-Acha ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4570101408257
License date	Apr 15, 2019
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Clinical Oral Implants Research
Licensed Content Title	In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces
Licensed Content Author	Ralf Bürgers, Till Gerlach, Sebastian Hahnel, et al
Licensed Content Date	Jan 11, 2010
Licensed Content Volume	21
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	9
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Características del biofilm oral formado sobre implantes dentales
Expected completion date	Jul 2019
Expected size (number of pages)	126
Requestor Location	Ms. Berta Cortés-Acha C/Aoiz nº7-6ªA Pamplona, Navarra 31004 Spain Attn: Ms. Berta Cortés-Acha
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work

<https://s100.copyright.com/App/PrintableLicenseFrame.jsp?publis...-7235-4ab5-b7f1-92080e6bf558%20%20&targetPage=printablelicense>

Página 1 de 5

Permiso de reproducción de la Figura 1ª y Figura 3 del artículo de Heuer y cols. 2007 (16)

RightsLink Printable License

15/4/19 10:39

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 15, 2019

This Agreement between Ms. Berta Cortés-Acha ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4570110077906
License date	Apr 15, 2019
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Oral Rehabilitation
Licensed Content Title	Analysis of early biofilm formation on oral implants in man
Licensed Content Author	W. HEUER, C. ELTER, A. DEMLING, et al
Licensed Content Date	Apr 13, 2007
Licensed Content Volume	34
Licensed Content Issue	5
Licensed Content Pages	6
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	2
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1a Figure 3
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Características del biofilm oral formado sobre implantes dentales
Expected completion date	Jul 2019
Expected size (number of pages)	126
Requestor Location	Ms. Berta Cortés-Acha C/Aoiz nº7-6ªA Pamplona, Navarra 31004 Spain Attn: Ms. Berta Cortés-Acha
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work

<https://s100.copyright.com/App/PrintableLicenseFrame.jsp?publi...-65c9-495c-9551-bca26d07dbe6%20%20&targetPage=printablelicense>

Página 1 de 5



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

Programa de Doctorat en Medicina i Recerca Translacional

Tesis Doctoral

Características del biofilm oral formado sobre implantes dentales

DOCTORANDA

Berta Cortés Acha

DIRECTORES DE TESIS

Prof. Dr. Eduard Valmaseda Castellón

Dr. Rui Figueiredo

Universitat de Barcelona. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Departament
d'Odontostomatologia